

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS BENÉFICAS PRESENTES NO CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO EM SISTEMA DE BIOFLOCOS¹

Karina Elize Krüger²; Carlos de Mello Junior³; Moisés Poli⁴; Bárbara Priscila Pereira da Silva⁵; Bruna Letícia Teixeira⁶; Delano Dias Schleder⁷

INTRODUÇÃO

No Brasil, a carcinicultura tem sido afetada por diversas patologias, sobretudo causadas por vírus e bactérias. Desta forma, para o avanço desse setor produtivo se faz necessário o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais biosseguros. O cultivo de camarões em sistema de bioflocos (*Bio-Floc Technology-BFT*) pode ser uma excelente alternativa, por se tratar de um sistema de cultivo fechado (com pouca ou nenhuma troca de água) que permite uma elevada densidade de estocagem, o que possibilita a redução da descarga de efluentes no ambiente e o incremento da produtividade e biossegurança. (MCINTOSH et al., 2000; BURFORD et al., 2004).

O sistema BFT depende significativamente da comunidade bacteriana para manter a estabilidade e ciclagem dos nutrientes na água (WASIELESKY et al., 2006), sendo imprescindível que os flocos microbianos sejam constituídos por bactérias benéficas ao sistema e aos animais.

Crab et al. (2010) demonstraram que a comunidade bacteriana presente nos bioflocos pode inibir a ploriferação de bactérias patogênicas do gênero *Vibrio*, principais causadoras de doenças em camarões marinhos, através da interrupção da comunicação célula-a-célula entre estas bactérias (*quorum sensing*). Atualmente, diversas substâncias produzidas por organismos aquáticos e outras bactérias, como as furanonas halogenadas e lactonases, têm demonstrado um potencial de inibição destes mediadores (CRAB et al., 2010; DEFOIRD et al., 2008).

¹Fomento: CNPq - Bolsa de Iniciação Científica

²Instituto Federal Catarinense – Câmpus Araquari. Curso de Medicina Veterinária. E-mail: karina.elize@hotmail.com

³Concepto Azul. E-mail: conceptoazul@hotmail.com

⁴Concepto Azul. E-mail: conceptoazul@hotmail.com

⁵Instituto Federal Catarinense – Câmpus Araquari. Curso de Medicina Veterinária. E-mail: barbaraprisila_silva@hotmail.com

⁶Instituto Federal Catarinense – Câmpus Araquari. Curso Técnico em Informática. E-mail: brunaleteiateixeira@hotmail.com

⁷Instituto Federal Catarinense – Câmpus Araquari. Docente. E-mail: schleder@ifc-araquari.edu.br

Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização das bactérias presentes no sistema BFT.

PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O cultivo de camarões marinhos em sistema BFT foi realizado na estufa experimental (216 m²) do Instituto Federal Catarinense – câmpus Araquari. Para o povoamento, nove mil pós-larvas de camarões (PL-20) foram aclimatadas por 3 horas e transferidas para 6 tanques de 15 m³ revestidos com geomembrana de 8mm, contendo água salgada, previamente clorada, com salinidade de 20-25% (densidade final: 200 pós-larvas/m³).

As coletas foram feitas a cada 2 semanas ao longo do cultivo (semana 0, 2, 4, 6, 8, 10). Nas cinco primeiras foi amostrado apenas o biofoco (acompanhamento da formação da comunidade bacteriana), e na última coleta foram amostrados o biofoco, o biofilme (comunidade microbiana aderida às paredes dos tanques), e o trato digestivo dos camarões, para observar a distribuição desta comunidade microbiana em estágio maduro de formação.

As amostras coletadas foram transferidas para microtubos contendo TSB (Caldo de Triptona Soja), diluídas (fator 1:10) e incubadas a 37°C por 20 min. Em seguida, foram semeadas em meio TSA (Agar Triptona Soja) e TCBS (Agar de Tiosulfato, Citrato, Bile e Sacarose), e incubadas a 37°C por 24 horas.

Após a incubação, as colônias obtidas foram caracterizadas macroscopicamente e então diluídas (fator 1:10) em TSB. Posteriormente, foram realizados sucessivos esgotamentos por estria (meio TSA) até a obtenção de colônias individualizadas (puras), que, por sua vez, foram caracterizadas (método de Gram), acondicionadas em microtubos de 1,5mL contendo glicerol e TSB (1:1 v/v) e armazenadas a -20°C.

Para os procedimentos de biologia molecular, as cepas armazenadas foram reativadas em meio TSB (24h à 37°C), centrifugadas a 15000 xg por 2 min. e o sobrenadante substituído por tampão PBS, para dar início ao procedimento de extração do DNA e posterior amplificação da sequência 16S rRNA por PCR, para identificação molecular, e do fragmento específico do gene para lactonase (metodologia adaptada da empresa Concepto Azul®, DIRINGER et al., 2010). A taxonomia molecular foi realizada através do software BLAST®, pelo qual a

sequência amplificada foi comparada com as de outros organismos disponíveis no banco de sequências (GENEBANK).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante o experimento, 154 cepas foram isoladas a partir dos bioflocos, do biofilme e do trato digestivo dos camarões. Primeiramente, as cepas dos 3 tanques que apresentaram maior sobrevivência (n=84) foram identificadas molecularmente e avaliadas quanto à produção de lactonase.

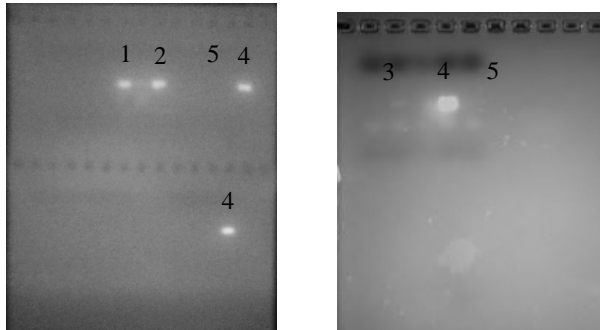
Dentre as 84 cepas encaminhadas para identificação, 11 não apresentavam analogia com as sequências disponíveis no Genbank, e 25 foram novamente amplificadas e encaminhadas para identificação, devido à baixa qualidade do material enviado.

Como nenhuma das bactérias pré-selecionadas apresentaram resultados positivos para lactonase, as cepas dos demais tanques foram submetidas à avaliação da produção desta enzima e enviadas para identificação molecular. A partir destas, foram detectadas três cepas lactonase positivas (figura 1), todas isoladas a partir do biofoco do mesmo tanque e obtidas na última coleta realizada no experimento.

Mais de 50% das cepas isoladas do biofoco dos 6 tanques foram obtidas a partir das 2 últimas coletas (semana 8 e 10), o que demonstra o aumento da diversidade da comunidade bacteriana a medida que o biofoco se torna maduro. Estes achados estão de acordo com Mcintosh (2000) que relatou que a comunidade heterotrófica, caracterizada principalmente por flocos compostos de células bacterianas, desenvolve-se aproximadamente entre 7 a 8 semanas de cultivo.

Em consonância com o observado no presente projeto, Dolfing e Gottschal (1997) relatam que uma comunidade bacteriana estável geralmente resulta da substituição de todos os membros de uma comunidade inicial por organismos mais adaptados e altamente seletivos, que acabam limitando as condições de crescimento entre si e causando o aumento da diversidade. Essas condições limitantes são ocasionadas, principalmente, por ação enzimática dos organismos, competição por nutrientes e por espaço. Estes mecanismos de ação são vantajosos, uma vez que podem prevenir a ocorrência de bactérias indesejadas sem estimular o surgimento de resistência, comum em tratamentos com antibióticos.

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose (2%) representando os produtos amplificados, por PCR, do gene da lactonase de bactérias isoladas do biofilme. 1) Cepa 86, 2) Cepa 88, 3) Cepa 87, 4) Controles positivos (lactonase) 5) Controles negativos.



A seleção de bactérias benéficas tem sido efetuada na tentativa à substituição de antibióticos, investindo-se especialmente em bactérias probióticas. A utilização de bactérias nos tanques de cultivo pode interferir na comunidade bacteriana da água, assim reduzir ou eliminar espécies patogênicas de microrganismos através de processos competitivos, melhorando a qualidade da água de cultivo bem como o crescimento e a sobrevivência das espécies cultivadas (HAVENAAR et al., 1992; VERSCHUERE et al., 2000). E no caso do sistema de biofilos, estes filcos microbianos, ao serem consumidos pelos camarões, podem contribuir para nutrição, promover imunidade ao camarão e reciclagem dos nutrientes no ambiente de cultivo (McNEIL, 2000).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade da comunidade bacteriana do sistema de biofilos aumentou conforme o incremento do material orgânico em suspensão (biofilos) e do estágio de maturação dos mesmos. A comunidade microbiana em estágio inicial apresentou maior proporção de bactérias oportunistas e patogênicas (gênero *Vibrio* e *Shewanella*), enquanto que em estágio mais avançado de maturação esta proporção diminuiu, com conseqüente incremento de bactérias potencialmente benéficas, cocos e bacilos, sendo 3 produtoras de lactonase.

REFERÊNCIAS

BURFORD, M.A.; THOMPSON, P.J.; MCINTOSH, R.P.; BAUMAN, R.H.; PEARSON, D.C. **The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high - intensity, zero - exchange system.** *Aquaculture*, v.232, p.525 - 537, 2004.

CRAB R.; LAMBERT, A.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE W. **The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*.** *Journal of Applied Microbiology*, v.109, p. 1643-1649, 2010.

DIRINGER, B.; VERA, T.; TORRES, T. **Periphyton domestication offers feed in shrimp culture.** *Global Aquaculture Advocate*, jan/fev, 2010.

DOLFING, J., GOTTSCHAL, J.C., 1997. Microbe–microbe interactions. In: Mackie, R.I., Withe, B.A., Isaacson, R.E.Eds., *Gastrointestinal Microbiology*, Vol. 2, *Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*. Chapman & Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York, pp. 373–433.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Selection of strains for probiotic use. In: R. FULLER (Ed.), *Probiotics: the scientific basis*, Chapman and Hall, London. 1992. p. 209-224.

MCINTOSH, B. J; SAMOCHA, T.M.; JONES, E.R; LAWRENCE, A.L.; MCKEE, D.A.; HOROWITZ, S.; HOROWITZ, A. **The effect of a bacterial supplement on the high - density culturing of *Litopenaeus vannamei* with low - protein diet on outdoor tank system and no water exchange.** *Aquacultural Engineering*, 21: 215 – 227, 2000.

McNEIL, R. Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. **The Global Aquaculture Advocate**, v.3, 72–76, 2000.

RAVI, A.V. et al. **Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture.** *Letters in Applied Microbiology*, v.45, p.219 - 223, 2007.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.655-671, 2000.

WASIELESKY, W.; ATWOOD, H.; STOKES, A.; BROWDY, C. **Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*.** *Aquaculture*, v.258, p.396-403, 2006.