

USO DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO NO CONTROLE DE VIBRIONÁCEAS EM VIVEIROS DE CULTIVO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* EM SANTA CATARINA

José Luiz Pedreira MOURIÑO ^{1,6}; Celso Carlos BUGLIONE Neto ²; Felipe do Nascimento VIEIRA ³; Cristina RAMIREZ ⁴; Walter Quadros SEIFFERT ¹; Maurício Laterça MARTINS ⁵; Fabiola Santiago PEDROTTI ²; Rodrigo SCHVEITZER ¹

RESUMO

As doenças de origem bacteriana, principalmente aquelas causadas por organismos do gênero *Vibrio*, são responsáveis por perdas econômicas significativas na indústria de camarões. Este trabalho objetivou determinar a concentração de hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] capaz de inibir *in vitro* o crescimento de *Vibrio harveyi*, e testar *in vivo* sua utilização em viveiros de cultivo. Para o experimento *in vitro* utilizaram-se frascos com meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion), o qual foi suplementado com Ca(OH)₂ em quatro diferentes concentrações: 0; 0,018 g/L; 0,025 g/L; 0,036 g/L, inoculado com 1,2x10¹¹ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL e incubado por 24 h com agitação contínua. Nos quatro tratamentos, o crescimento bacteriano foi estimado por contagem total de colônias em placas, pelo método de diluições sucessivas (1/10). Para o experimento em viveiros utilizou-se Ca(OH)₂ na concentração de 0,018 g/L, adicionado de forma fracionada durante três dias de cultivo. A concentração de bactérias totais em meio de cultura Agar Marine e de vibriões em meio de cultura TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose) foi avaliada por contagem total de colônias em placas, antes e 48 h após a aplicação do hidróxido de cálcio. Após a aplicação do hidróxido de cálcio, a concentração de vibriões diminuiu ($p < 0,05$) de 4,36±0,1 (log UFC/mL±DP) para 3,07±0,36 (log UFC/mL±DP), não sendo, porém, observado decréscimo significativo da concentração de bactérias totais. Desta forma, evidenciou-se que Ca(OH)₂ pode ser utilizado no controle de vibrioses em sistemas de cultivo.

Palavras-chave: *Vibrio*; *Litopenaeus vannamei*; hidróxido de cálcio

CONTROL OF *Vibrio* sp. USING CALCIUM HYDROXIDE IN POND OF SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) CULTURE IN SANTA CATARINA

ABSTRACT

Bacterial diseases, mainly those caused by bacteria of the *Vibrio* genus, are responsible for significant economic losses in the shrimp production. This study aimed to verify the concentration of calcium hydroxide [Ca(OH)₂] able to inhibit growth of *Vibrio harveyi* *in vitro*, and also to test *in vivo* its use in culture ponds. For the *in vitro* experiment, bottles were used with BHI culture medium (Brain Heart Infusion) supplemented with Ca(OH)₂ in four different concentrations (0; 0.018 g/L; 0.025 g/L and 0.036 g/L), inoculated with 1.2 x 10¹¹ CFU/mL and incubated for 24 h

Nota Científica: Recebida em 21/8/2006 – Aprovada em 29/3/2007

¹ Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), CCA, Universidade Federal de Santa Catarina
e-mail: mourino@lcm.ufsc.br

² Graduando em Engenharia de Aqüicultura, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina

³ Mestrando em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina

⁴ Universidad Del Valle, Calle 13, no 100-00, Cali, Colombia - e-mail: crisramil@gmail.com

⁵ Laboratório de diagnóstico e Patologia Aquática, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina
e-mail: mlaterca@cca.ufsc.br

⁶ Endereço/Address: Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Camarões Marinhos
Rua Beco dos Coroas, fundos – Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, CEP: 88062-601

under continuous agitation. The bacterial growth in the treatments was estimated by total counting of colonies in plates by successive dilutions (1/10). For the experiment in culture ponds, calcium hydroxide in the concentration of 0.018 g/L was applied for three consecutive days. Total counting of colonies in Marine agar and TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose) plates was done before and 48 h after calcium hydroxide application. The *Vibrio* concentration decreased significantly after the application, from 4.36 ± 0.1 (log UFC/mL \pm DP) to 3.07 ± 0.36 (log UFC/mL \pm DP). However, significant decrease in the concentration of total bacteria was not observed. In this way, it was evidenced that Ca(OH)_2 can be used in the control of *Vibrio* spp. in rearing systems.

Key words: *Vibrio*; *Litopenaeus vannamei*; calcium hydroxide

INTRODUÇÃO

As doenças são responsáveis por perdas econômicas significativas na indústria de camarões. Com a evolução das técnicas de identificação de microrganismos, constatou-se que as bactérias que causam infecções presentes em organismos aquáticos são predominantemente Gram-negativas (LIGHTNER e REDMAN, 1998).

Dentre as bactérias patogênicas que afetam o camarão, destacam-se as do gênero *Vibrio*. A septicemia provocada por vibriose é caracterizada pelos sinais clínicos de estresse, como musculatura abdominal opaca, anorexia, expansão dos cromatóforos e presença de necroses (SONG *et al.*, 1993). Este grupo de bactérias tem causado mortalidades em larviculturas e na engorda de camarões em diferentes países (ABRAHAM e PALANIAPPAN, 2004). *Vibrio harveyi* é um dos agentes infecciosos responsável pela “doença luminescente” em camarões, que causa grandes perdas nessas atividades (RUANGPAN *et al.*, 1999).

Os vibriões são encontrados normalmente na flora intestinal de camarões saudáveis, e a ocorrência de doenças é resultado de predisposição dos camarões ao estresse, combinada com a presença de alguma cepa de *Vibrio* oportunista (LIGHTNER e REDMAN, 1998).

Para o controle destas enfermidades, a profilaxia com antibióticos tem sido a estratégia mais utilizada em carcinicultura (SKJERMO e VADSTEIN, 1999). Porém, o uso massivo de antibióticos tende a selecionar cepas de bactérias resistentes aos mesmos (HOLMSTRÖM *et al.*, 2003).

Uma medida profilática comum na aquicultura asiática é a aplicação de hidróxido de cálcio [Ca(OH)_2] em viveiros de cultivo para combater doenças e melhorar a qualidade de água (FAIRWEATHER, 1999). Segundo CHINABUT (1994), o hidróxido de cálcio tem ação sanitizante, e sua aplicação em

viveiros de peixes durante mortalidades foi eficaz no controle destas.

Este trabalho objetivou determinar *in vitro* a dosagem inibitória de hidróxido de cálcio sobre *Vibrio harveyi* e vibriões de viveiros de cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o teste *in vitro* foram utilizados frascos com 200 mL de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) ao qual foi adicionado hidróxido de cálcio em quatro diferentes concentrações: 0; 0,018; 0,025; 0,036 g/L, com quatro repetições cada uma. Após esta preparação, em cada frasco, o meio de cultura foi inoculado com $1,2 \times 10^{11}$ UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mL) de *V. harveyi* (U.H. 2343) e, a seguir, incubado por 24 h em banho microprocessado, com agitação contínua e à temperatura de 28 °C. Passado este período, o crescimento de *V. harveyi* em todos os tratamentos foi estimado pela contagem do número total de colônias formadas nas placas. Para isto, o material de cada frasco, após diluições sucessivas (1/10 até a diluição 10^{-8}), foi semeado em placas de Agar TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose:meio para crescimento de vibriões) e incubado a 30 °C por 24 h, para posterior contagem do número de colônias formadas.

Foram utilizados três viveiros de terra de 1,5 ha cada um, localizados em Laguna, Santa Catarina. Os viveiros foram povoados com 15 camarões/m² com peso médio aproximado de 2 gramas. Amostras de água foram coletadas próximo às comportas de escoamento e, após diluições sucessivas (1/10 até a diluição 10^{-5}), semeadas em meio de cultura Agar Marine, para contagem total de bactérias, e em Agar TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose), para contagem total de organismos do gênero *Vibrio*. Após a contagem, aplicou-se Ca(OH)_2 na concentração de 60 kg/ha.dia, de forma homogênea por toda a

superfície do viveiro durante três dias consecutivos (totalizando a concentração de 0,018 g/L ou 180 kg/ha). Passadas 48 h da aplicação de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, novas amostras de água foram coletadas, sendo repetido o procedimento descrito anteriormente.

Para ambos os experimentos, os valores obtidos apresentaram heterogeneidade de variância pelo teste de Bartlett, sendo transformados para logaritmo (\log_{10}), para homogeneização das variâncias. Para o experimento *in vitro* foi realizada análise de variância, para verificar a existência ou não de diferenças significativas entre os tratamentos, e posteriormente o teste de separação de médias SNK. Para o experimento em viveiros, utilizou-se o t-teste para avaliar a ocorrência de diferenças significativas entre as contagens de bactérias antes e após a aplicação de hidróxido de cálcio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o hidróxido de cálcio tem a capacidade de inibir, *in vitro*, o crescimento de *Vibrio harveyi*. A concentração de 0,036 g/L de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ proporcionou a maior inibição de *Vibrio harveyi* ($7,63 \pm 0,30 = \log \text{UFC/mL}$), seguida pela concentração de 0,025 g/L ($8,16 \pm 0,09 = \log \text{UFC/mL}$), que não diferiu da concentração 0,018 g/L ($8,39 \pm 0,37 = \log \text{UFC/mL}$). No frasco em que não se adicionou $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ao meio de cultura, observou-se maior crescimento bacteriano: $11,03 \pm 0,02 = \log \text{UFC/mL}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito inibitório *in vitro* de diferentes concentrações de hidróxido de cálcio (g/L) aplicado ao meio de cultura BHI sobre o crescimento de *Vibrio harveyi*. (UFC=Unidade Formadora de Colônia)

Concentração de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no meio de cultura	UFC/mL 24 h após a aplicação de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($\log x \pm \text{DP}$)
0	$11,03 \pm 0,02$ a*
0,018	$8,39 \pm 0,37$ b
0,025	$8,16 \pm 0,09$ b
0,036	$7,63 \pm 0,30$ c

* Letras distintas indicam diferença significativa pelo SNK ($p < 0,05$).

A inibição do crescimento de *V. harveyi* por hidróxido de cálcio pode estar relacionada à capacidade deste composto em inibir a ação de enzimas bacterianas, gerando efeito antimicrobiano e ativando enzimas teciduais, como a fosfatase alcalina, e conduzindo ao efeito de melanização ou cicatrização.

Vários trabalhos evidenciaram a participação ativa de íons cálcio no processo de mineralização (PASHLEY *et al.*, 1986; SEUX *et al.*, 1991; WAKABAYASHI *et al.*, 1993). Ao entrar em contato com a água, o hidróxido de cálcio libera íons hidroxila, os quais, segundo SAFAVI e NICHOLS (1994), agem sobre as bactérias Gram-negativas, hidrolisando os lipopolissacarídeos da parede celular bacteriana e, assim, degradando o lipídio A e ocasionando a lise celular. ESTRELA *et al.* (2001) demonstraram efeito semelhante de inibição, causado pelo hidróxido de cálcio *in vitro*, sobre outros microrganismos, tais como *Micrococcus luteus* (ATCC 9341); *Staphylococcus aureus* (ATCC6538); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586); *Escherichia coli* e *Streptococcus sp.*

No experimento em viveiros, a concentração de 0,036 g/L de hidróxido de cálcio foi excluída, devido à ação floculante do hidróxido quando em altas concentrações (VINATEA, 2004), o que poderia provocar a precipitação de todas as microalgas presentes na água do viveiro. Como a concentração 0,018 g/L (180 kg/ha) não diferiu significativamente da concentração 0,025 g/L (250 kg/ha) quanto à inibição *in vitro*, utilizou-se a primeira por ser economicamente mais viável em larga escala.

A aplicação de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ na água dos viveiros de camarão reduziu significativamente a carga de vibriónáceas, tanto as sacarose-positivas quanto as negativas, não reduzindo, porém, a carga de bactérias totais no viveiro de cultivo (Tabela 2).

O hidróxido de cálcio atua contra todos os tipos de microrganismos, dentre eles, os aeróbios, microaerófilos e anaeróbios, inativando sistemas enzimáticos presentes na membrana citoplasmática, com a subsequente alteração de mecanismos biológicos dependentes da membrana, e promovendo efeitos tóxicos e lesivos às células microbianas (ESTRELA *et al.* 1995). Os resultados obtidos neste trabalho, porém, sugerem que o hidróxido de cálcio pode estar agindo de maneira seletiva, reduzindo de forma mais eficiente a população de vibriónáceas da água.

Como constatado neste trabalho, o hidróxido de cálcio possui propriedades que possibilitam seu emprego na aquíicultura, em razão de sua eficácia antimicrobiana. A efetividade antimicrobiana conferida pela aplicação do hidróxido de cálcio pode proporcionar aumento expressivo do índice de sucesso de seu uso no tratamento de necroses causadas por vibriónáceas.

Tabela 2. Concentração de bactérias na água de viveiros de cultivo de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) antes e 48 h após a aplicação de Ca(OH)_2

População	UFC/mL \pm DP, antes da aplicação de Ca(OH)_2 (log UFC/mL \pm DP)	UFC/mL \pm DP, 48 h após aplicação de Ca(OH)_2 (log UFC/mL \pm DP)
Colônias verdes em TCBS	4,13 \pm 0,067 a*	2,64 \pm 0,427 b
Colônias amarelas em TCBS	3,94 \pm 0,24 a	2,86 \pm 0,327 b
TCBS total	4,36 \pm 0,10 a	3,07 \pm 0,36 b
Contagem total em Agar Marine	4,48 \pm 0,62 a	3,57 \pm 0,96 a

* Letras distintas indicam diferença significativa pelo t-teste ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, T.J. e PALANIAPPAN, R. 2004 Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. *Aquaculture*, Amsterdam, 232(4): 81-90.
- CHINABUT, S. 1994 EUS in Thailand. In: ROBERTS, R.J.; CAMPBELL, B.; MACREA, I.H. (Ed.). *Proceedings of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative Syndrome*. Bangkok. p.58-60.
- ESTRELA, C.; SYDNEY, G.B.; BAMMANN, L.; FELIPE, O. 1995 Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Brazilian Dental Journal*, Ribeirão Preto, 6(2): 85-90.
- ESTRELA, C.; BAMMANN, L.L.; PIMENTA, F.C.; PÉCORA, J.D. 2001 **Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes**. *International Endodontic Journal*, London, 34(5): 341-345.
- FAIRWEATHER, D.J. 1999 *Development of a bath challenge system to study component causes, and preventive treatments, of epizootic ulcerative syndrome (eus) in snakehead fish (Channa striata)*. Plymouth. 88p. (Dissertação de Mestrado. Universidade de Plymouth).
- HOLMSTRÖM, K.; GRASLUND, S.; WAHLSTROM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B.E.; KAUTSKY, N. 2003 Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, 38(3): 255-266.
- LIGHTNER, D.V. e REDMAN, R.M. 1998 Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, Amsterdam, 164(4): 201-220.
- PASHLEY, D., KALATHOOR, S., BURNHAM, D. 1986 The effects of calcium hydroxide on dentin permeability. *Journal of Dental Research*, 65(3): 417-420. RUANGPAN, L.; DANAYADOL, Y.; DIREKBUSARAKOM, S.; SIURAIRATANA, S.; FLEGEL, T. 1999 Lethal toxicity of *Vibrio harveyi* to cultivated *Penaeus monodon* induced by a bacteriophage. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorff, 35: 195-201.
- SAFAVI, K. e NICHOLS, F.C. 1994 Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *Journal of Endodontics*, Baltimore, 20(3): 127-129.
- SEUX, D.; COUBLE, M.L.; HARTMANN, D.J.; GAUTHIER, J.P.; MAGLOIRE, H. 1991 Odontoblast like cytodifferentiation of human pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide contaminating cement. *Archives of Oral Biology*, 36(2): 117-128.
- SKJERMØ, J. e VADSTEIN, O. 1999 Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, Amsterdam, 177(1-4): 333-343.
- SONG, Y.L.; CHENG, W.; WANG, C.H. 1993 Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infections for cultured shrimp in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology*, Nova York, 61(1): 24-31.
- VINATEA, L. 2004 *Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões*. 2. ed. Florianópolis: Editora da UFSC. 231p.
- WAKABAYASHI, H.; HORIKAWA, M.; FUNATO, A.; ONODERA, A.; MATSUMOTO, K. 1993 Bio-microscopical observation of dystrophic calcification induced by calcium hydroxide. *Endodontics and Dental Traumatology*, Copenhagen, 9(4): 105-111.