

# Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha-branca em fazendas de camarões de Santa Catarina

Sérgio Winckler da Costa<sup>(1)</sup>, Luiz Rodrigo Mota Vicente<sup>(1)</sup>, Talita Medeiros de Souza<sup>(2)</sup>,  
Edemar Roberto Andreatta<sup>(2)</sup> e Maria Risoleta Freire Marques<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, nº 1.347, Itacorubi, CEP 88034-901 Florianópolis, SC. E-mail: winckler@epagri.sc.gov.br, luizmota.vicente@gmail.com <sup>(2)</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Reitor João David Ferreira Lima, Bairro Trindade, CEP 88040-970 Florianópolis, SC. E-mail: andreatta@mbox1.ufsc.br, talitamsbio@yahoo.com.br, risomar@mbox1.ufsc.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre parâmetros físico-químicos e biológicos do cultivo de camarão com a enfermidade causada pelo vírus da síndrome da mancha-branca (WSSV). Foram avaliadas a mortalidade, as características físicas e químicas da água e do solo, e foram realizados os exames e as análises microscópicas a fresco, presença de vibrios na hemolinfa, além do diagnóstico histopatológico e molecular (PCR) do WSSV, em viveiros de oito fazendas de Santa Catarina, entre 2008 e 2009. O vírus foi detectado em cinco fazendas com registros da enfermidade em ciclos anteriores. A temperatura da água foi semelhante entre as fazendas com e sem WSSV, e a mortalidade ocorreu a intervalos ascendentes entre 24,6 e 29,29°C. Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros de análises microscópicas a fresco, tempo de coagulação e presença de vibrios na hemolinfa e sinais clínicos, entre viveiros com e sem WSSV. As concentrações de nitrito, sílica, fenol e alcalinidade na água e pH do solo tiveram diferenças significativas entre os viveiros afetados ou não por WSSV. Os valores de nitrito, sílica e pH do solo estavam dentro dos limites recomendados para o cultivo de camarões, no entanto, isto não ocorreu com a alcalinidade e a concentração de fenol, o que sugere uma relação dos últimos com a manifestação da enfermidade da mancha-branca.

Termos para indexação: *Litopenaeus vannamei*, alcalinidade, fenol, vírus da mancha-branca, WSSV.

## Cultivation parameters and the white spot disease in shrimp farms in Santa Catarina, Brazil

**Abstract** – The objective of this work was to evaluate the relationship among physicochemical and biological parameters in shrimp cultivation with the disease caused by the white spot syndrome virus (WSSV). The occurrence of mortality, physical and chemical characteristics of water and soil were evaluated, and clinical and microscopic analyses and the presence of vibrio in hemolymph, were performed as well as the histopathological and molecular diagnosis (PCR) of the WSSV in ponds of eight farms in Santa Catarina, Brazil, between 2008 and 2009. The virus was detected in five farms, which had displayed the disease in previous cycles. The temperature of the water was similar among farms independently of the presence of the virus, and mortality occurred at ascendant temperature intervals, between 24,6 and 29,29°C. No significant differences were found for the parameters of microscopic analyses among ponds either with or without the virus. Nitrite, silica, phenol and water-alkalinity concentrations, as well as soil pH values, showed significant differences among the ponds affected or not by the WSSV. Nitrite, silica and pH values were within the recommended limits for shrimp cultivation, however this did not occur for the alkalinity and phenol concentrations, which suggests a relationship of the latter parameters with manifestation of the white spot disease.

Index terms: *Litopenaeus vannamei*, alkalinity, phenol, white spot syndrome virus, WSSV.

## Introdução

Enfermidades virais têm provocado sérios impactos econômicos nos cultivos de camarões peneídeos nos principais países produtores, entre as quais se destaca a doença da mancha-branca causada pelo

vírus da síndrome da mancha-branca (WSSV – White Spot Syndrome Virus) (Lightner, 2005). O primeiro registro da enfermidade da mancha-branca, no Oceano Atlântico, ocorreu em 2005 em fazendas do Estado de Santa Catarina (Seiffert et al., 2005). Assim como relatado sobre outros países, os efeitos da enfermidade

nessa região foram desastrosos, tendo provocando queda de aproximadamente 95% na produção, que passou de 4.189 Mg, em 2004, para 172 Mg, em 2009 (Costa, 2010).

Alterações na qualidade física e química da água dos viveiros de cultivo podem ocasionar estresse e alteração no estado imunológico dos camarões, tornando-os suscetíveis ao ataque de patógenos (Kautsky et al., 2000).

Uma das principais características da mancha-branca é a replicação viral mediante condições de estresse (Lo et al, 2005). Fatores como a temperatura da água, salinidade, oxigênio dissolvido, amônia, pH e toxinas derivadas de pesticidas tem sido associados a mortalidades massivas atribuídas ao WSSV (Fegan & Clifford, 2001).

Poucos estudos foram realizados para buscar uma associação entre os parâmetros físico-químicos e biológicos e a manifestação da mancha-branca em fazendas de camarão. Corsin et al. (2001) apontaram a localização das fazendas, o peso médio dos camarões no primeiro mês de cultivo, as datas de povoamento e o uso de rações comerciais como fatores de risco para infecção por WSSV, em sistemas de cultivo de camarão em arrozais no Vietnã. Peinado-Guevara & López-Meyer (2006) relacionaram a alteração de parâmetros de cultivo, em consequência do período de

fortes chuvas, com a ocorrência de mortalidade pelo WSSV em viveiros de camarão no México.

Em razão do grande impacto, causado pelo vírus da mancha-branca na indústria de criação de camarões do Estado de Santa Catarina, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre parâmetros físico-químicos e biológicos do cultivo de camarão com a enfermidade causada pelo vírus da síndrome da mancha-branca.

## Material e métodos

O estudo foi realizado em dois viveiros de oito fazendas de camarões, dos quais seis em 2008 – cinco no Município de Laguna (B, C, E, F e G) e uma no Município de Biguaçu (A) – e duas em 2009, no Município de Laguna (D e G) (Tabela 1), no Estado de Santa Catarina.

A Fazenda A não teve diagnóstico ou mortalidade pela mancha-branca em ciclos anteriores. A Fazenda B não teve mortalidade nem diagnósticos positivos nos cultivos de 2006 e 2007. A Fazenda C teve mortalidade no ano de 2006, e não teve cultivo no ano de 2007. A Fazenda D teve mortalidade no ano de 2005 e não realizou cultivos em 2006, 2007 e 2008. As Fazendas E e F tiveram mortalidade em 2004 e 2005, não cultivaram no ano de 2006, e tiveram mortalidade em 2007. A Fazenda G teve mortalidade em 2005, 2006

**Tabela 1.** Localização das fazendas, área dos viveiros, data de povoamento, ocorrência de mortalidade anterior por mancha-branca (WSSV) e densidade de camarões por viveiro.

Fazenda	Viveiro v	Município	Coordenadas	Área (ha)	Data do Povoamento	Mortalidade <sup>(1)</sup>	Densidade por m <sup>2</sup>
A	V1	Biguaçu	27°24'56,4"S	3,2	24/1/2008	-	15,0
	V3		48°36'22"W	3,7	24/1/2008	-	15,0
B	V1	Laguna	28°35'24,5"S	4,5	18/12/2007	-	11,0
	V2		48°50'15,1"W	4,9	18/12/2007		10,0
C	V2	Laguna	28°31'26,3"S	3,5	5/2/2008	S	9,4
	V7		48°47'48,3"W	3,5	5/2/2008	S	9,4
D(2009)	V2	Laguna	28°29'7'48"S	5,0	11/2/2009	S	8,0
	V3		48°47'54,5"W	4,6	11/2/2009	S	8,6
E	V2	Laguna	28°21'44,8"S	4,0	18/12/2007	S	3,8
	V3		48°53'21,5"W	3,5	18/12/2007	S	5,7
F	V1	Laguna	28°21'47"S	3,4	18/12/2007	S	8,9
	V2		48°53'18,5"W	3,1	18/12/2007	S	4,8
G/(2008)	V2	Laguna	28°31'31,2"S	2,5	11/1/2008	S	18,0
	V3		48°46'58,2"W	1,9	11/1/2008	S	15,8
G/(2009)	V1	Laguna	28°31'31,2"S	2,4	8/12/2008	S	7,9
	V2		48°46'58,2"W	2,5	8/12/2008	S	8,0

<sup>(1)</sup>Ocorrência de mortalidade por mancha-branca. -, sem ocorrência de mortalidade; S, com ocorrência de mortalidade.

e 2007. No ano de 2008, as fazendas foram povoadas com pós-larvas de três origens diferentes; a fazenda A utilizou pós larvas de banco de reprodutores cultivado em Santa Catarina; as fazendas B, E e F utilizaram pós-larvas produzidas a partir de náuplios do Nordeste; as fazendas C e G, pós-larvas de camarões sobreviventes à mortalidade por WSSV. No ano de 2009, as fazendas D e G povoaram com as pós-larvas produzidas a partir de camarões sobreviventes.

Os cultivos foram monitorados desde o povoamento até a despesca tendo-se registrado a quantidade de pós-larvas, peso dos camarões à colheita e biomassa final, para posterior cálculo da sobrevivência de cada viveiro. No caso de ocorrência de eventos de mortalidade, foram obtidas informações sobre o peso dos camarões e tempo de cultivo.

Semanalmente, foram coletados entre seis a dez camarões por viveiro, com auxílio de tarrafa, e o número de coletas por viveiro dependeu do tempo de cultivo. No momento da coleta, foi realizado o exame clínico dos camarões por meio da observação de alterações na coloração da carapaça, dos apêndices (pereiópodos, pleópodos, urópodos e antenas) e brânquias, deformidades no rostro, abdômen e apêndices, repleção intestinal. As informações foram registradas em planilha de amostragem (Cuéllar-Anjel, 2008). Em seguida, os camarões foram colocados em sacos de plástico com água e oxigênio, para transporte vivo até o Laboratório de Diagnóstico para Aquicultura (LADA), da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), no Município de Tubarão. No laboratório, com os camarões vivos, efetuou-se o cálculo do tempo de coagulação da hemolinfa (TCH) em segundos, a partir de amostras de hemolinfa retiradas com seringa de 1 mL, introduzida na parte ventral do camarão, entre o cefalotórax e o primeiro somito abdominal, e espalhadas em lâmina histológica (Aguirre-Guzmán & Sánchez Martínez, 2005), no total de 96 análises.

Para a análise presuntiva de vibrios, amostras individuais da hemolinfa (entre 0,1 a 0,3 mL) de seis camarões por viveiro, de sete amostras por fazenda, foram coletadas em câmara de fluxo Mini-flow 1 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), no total de 87 análises. A hemolinfa de cada camarão foi semeada em uma placa contendo meio de cultura TCBS (tiosulfato bile sacarose) (Acumedia, Neogen, Lansing, MI, USA) para posterior incubação em estufa por 24 horas à

temperatura de 35°C (Cuéllar-Anjel, 2008). Após o período de incubação, foi observado e registrado o número de placas com crescimento de colônias de vibrios em cada amostra, por viveiro, e o resultado foi expresso em percentual do total de amostras.

Utilizando-se as mesmas amostras de camarões, procedeu-se à análise a fresco, por meio da montagem de lâminas e observação direta de tecidos em microscópio óptico com objetivas de 10, 20, 50 e 100 X (Lightner, 1996; Aguirre-Guzmán & Sánchez-Martínez, 2005). Inicialmente, observou-se a presença de epicomensais nos pleópodos, pereiópodos e brânquias, e avaliou-se o grau de estresse a partir da observação da coloração dos apêndices e expansão dos cromatóforos. Posteriormente, fez-se a dissecação dos camarões, para observação de deformidades e quantidade de lipídios no hepatopâncreas e a presença de gregarinas, cianobactérias e restos de outros camarões (canibalismo) no conteúdo intestinal. Para cada parâmetro estudado, foi determinado um valor numérico do grau médio de severidade, em uma escala de 0 a 4, conforme critérios descritos por Lightner (1996) e Cuéllar-Anjel (2008). O número total de análises diferiu entre os parâmetros – entre 123 e 136 – e os resultados foram expressos em número de amostras por grau de severidade.

Para a realização de análise histopatológica, foram capturados camarões vivos, de tamanhos variados, nos quais foi injetada a solução de Davidson, em que foram mantidos por 24 horas. Em seguida, foram transferidos para uma solução de etanol 70%, a qual foi substituída por outra idêntica após 24 horas. Foram preparadas lâminas histológicas, coradas em hematoxilina e eosina (HE), de acordo com procedimento descrito por Lightner (1996). As lâminas foram examinadas em microscópio óptico, para observação da presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas, cercadas por cromatina marginal em tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica, características de infecção por WSSV (Wongteerasupaya et al., 1995). Foram examinadas duas lâminas por camarão, no total de 197 camarões analisados, cujo número variou entre os viveiros. Os resultados foram expressos pelo número de camarões com diagnóstico positivo, em relação ao total de camarões examinados, por viveiro.

A detecção do WSSV foi realizada por meio da análise de reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de pós-larvas, coletadas no momento do povoamento, e amostras de camarões capturados com

auxílio de tarrafa, em eventos de mortalidade ou na despesca de cada viveiro. Cada amostra era composta por 150 exemplares, pós-larvas inteiras ou pleópodos retirados dos camarões, fixados em etanol 95% e armazenados em frascos de plástico de 200 mL, na proporção de 1:10. As análises de PCR foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina. Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de Souza (2008) a partir de um conjunto de tecidos (pós-larvas ou pleópodos) de cinco animais da amostra inicial. Para pós-larvas foram realizadas duas análises por amostra de cada viveiro, e para camarões, foram feitas de duas a quatro análises de uma única amostra; sendo que para as fazendas C e G em 2008, foram realizadas análises em quatro amostras por viveiro, no total de 16 análises para pós-larvas e 77 para camarões. A detecção do WSSV foi realizada a partir da amplificação de um fragmento do genoma viral, pela reação em cadeia de polimerase em dois passos, *nested* PCR, em termociclador de 96 poços (TGradient, Biometra, Goettingen, DE), tendo-se utilizado dois pares de iniciadores – WS146F1/WS146R1 (externos) e WS146F2/WS146R2 (internos) – descritos por Lo et al. (1996) e recomendados pela OIE – Organização de Saúde Animal (2010). As reações de amplificação foram realizadas conforme Marques (2008), em um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , com 1  $\mu\text{L}$  de DNA (100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), Tris 10 mol  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  3,0 mol  $\text{L}^{-1}$ , 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cada dNTP, 140 nmol  $\text{L}^{-1}$  de cada iniciador (WS146F1 e WS146R1), e 1U de Taq DNA Polimerase (Biosystems, Curitiba, PR). A desnaturação inicial, a 94°C por 2 min, foi seguida de 39 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e 30 s e extensão a 72°C por 2 min. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 min. Após a amplificação, 1  $\mu\text{L}$  do produto foi adicionado ao segundo passo de amplificação (*nested* PCR) em uma mistura idêntica à descrita acima para a primeira reação, tendo sido, neste caso, utilizado o par de iniciadores WS146F2 e WS146R2. Após uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min, as condições da reação foram as seguintes: anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 min. Como controle positivo, utilizou-se uma amostra de DNA extraída

de pleópodo de *L. vannamei* positivo para o WSSV (Souza, 2008) e, como controle negativo, foi utilizada uma amostra sem DNA molde. A análise dos produtos de PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, após coloração com brometo de etídeo, e o resultado foi fotodocumentado em câmera digital. Os resultados foram expressos pelo número de análises positivas, em relação ao total de análises realizadas por viveiro.

A temperatura da água foi medida por meio de sensor eletrônico de registro de temperatura (Stowaway Tid Bit, Onset, Pocasset, USA), com medidas de 30 em 30 min, mantido fixo no local de coleta da água, em um viveiro por fazenda, com exceção das fazendas E e F, onde foi utilizado apenas um sensor por serem extremantes.

Foram realizadas coletas semanais de água e quinzenais de solo do fundo dos viveiros, ao longo de todo o cultivo, no período da manhã. As amostras de água foram coletadas na comporta de despesca, na interface água/solo, com um frasco coletor, e foram armazenadas em frascos de plástico. As amostras de solo foram coletadas na comporta de despesca retiradas de um perfil de 10 a 15 cm com auxílio de coletor de solo, e armazenadas em sacos de plástico. Após a coleta, as amostras de água e solo foram acondicionadas em caixas isotérmicas, para transporte até o Laboratório de Diagnóstico em Aquicultura, em Tubarão, SC.

A água foi previamente filtrada (14  $\mu\text{m}$ ) para posterior análise, conforme metodologia a seguir: pH, salinidade, por meio de refratômetro manual (precisão 0–100‰) (S/Mill-E, ATAGO, Saitama, JP); alcalinidade, pelo método titulométrico de neutralização, adaptado por Alfakit (2007); sulfetos totais, nitrato, amônia, nitrito, ferro, ortofosfato, fenol e sílica, pelo método colorimétrico para fotocolorímetro, adaptado por Alfakit (2007). A concentração de sulfeto não ionizável ( $\text{H}_2\text{S}$ ) foi calculada a partir dos valores de sulfeto total e os valores de pH e temperatura da água na coleta (Boyd, 1998). As determinações foram realizadas em um fotocolorímetro (modelo AT100PB, Alfakit, Florianópolis, SC, Brasil) que apresenta 100 curvas pré-programadas, compatível com a metodologia Standard Methods 2005 (American Public Health Association, 2005) com resolução de 0,01 mg  $\text{L}^{-1}$ , para concentração, e 0,01 para absorvância, com precisão relativa de 2%. Para cada parâmetro, foi realizado o total de 194 análises.

Para efetuar as análises de solo (exceto matéria orgânica), inicialmente, as amostras foram diluídas em água destilada, centrifugadas (2078.72 g) por cinco min e filtradas (14 µm). Para o cálculo dos parâmetros, foram levados em consideração o peso da amostra e o volume de água utilizado. Os parâmetros fenol, amônia, nitrato, nitrito, ortofosfato, sulfeto e pH, matéria orgânica e alumínio, foram analisados pelo método colorimétrico para fotocolorímetro, adaptado por Alfakit (2007), e as determinações foram feitas como descrito anteriormente, com 124 análises por parâmetro, exceto para matéria orgânica, com 79 análises.

Os resultados de cada parâmetro estudado foram agrupados de acordo com o diagnóstico da presença ou ausência de WSSV, por viveiro. Os resultados das análises microscópicas a fresco, entre os grupos com e sem WSSV, foram analisadas pelo teste de qui quadrado, a 5% de probabilidade. Os valores das análises físico-químicas da água e solo, tempo de coagulação da hemolinfa e presuntivo de vibrios, quando observada a distribuição normal e a homogeneidade das variâncias, foram analisados por meio do teste de comparação de médias "Z" e, caso contrário, pelo teste não paramétrico de Mann Whitney, tendo-se considerado o nível mínimo de significância de 5%.

## Resultados e discussão

Os resultados dos cultivos nas oito fazendas de camarões demonstram que houve mortalidade e diagnóstico positivo para WSSV em cinco fazendas, quatro no ano de 2008 e uma no ano de 2009 (Tabela 2). Foram registrados diagnósticos positivos para o WSSV por PCR, nas fazendas: C, viveiros 2 e 3; G, safra 2008, viveiros 2 e 3; E, viveiro 3; e G, safra 2009, viveiro 2. E foram registrados diagnósticos por histopatologia, nas fazendas: C, viveiro 2; F, viveiro 1; G, safra 2008, viveiros 2 e 3; E, viveiro 3; e G, safra 2009, viveiros 1 e 2. A sobrevivência observada nos viveiros das fazendas afetadas pelo WSSV foi baixa: de 3,26 a 23,8%, com exceção do viveiro 1 da Fazenda G, safra 2009 com 65%, onde ocorreu uma despesca emergencial, poucos dias após o início do cultivo. Nas Fazendas A, B, e D não foi verificada mortalidade, e houve sobrevivência com índices entre 36 e 55%, sem a observação de sinais clínicos de WSSV e com diagnósticos negativos por PCR e histopatológico.

A mortalidade e o diagnóstico de WSSV ocorreram em fazendas onde a enfermidade já havia se manifestado em ciclos anteriores, com exceção da Fazenda D, que permaneceu três anos sem cultivo após a última mortalidade por WSSV. Esses resultados indicam que o

**Tabela 2.** Data da mortalidade, tempo de cultivo e peso dos camarões no período de ocorrência da mortalidade, número de amostras positivas para mancha-branca (WSSV) por PCR, pelo número de análises realizadas, número de camarões positivos para WSSV por histopatologia pelo número total analisado e sobrevivência final por viveiro.

Fazenda	Viveiro	Mortalidade (data)	Tempo de cultivo (dias)	Peso na mortalidade (g)	Diagnóstico positivo		Sobrevivência (%)
					PCR	Histopatologia	
A	V1	-	-	-	0/3	0/10	36,0
	V3	-	-	-	0/2	0/20	49,8
B	V1	-	-	-	0/4	0/5	53,0
	V2	-	-	-	0/4	0/5	55,0
C	V2	3/3/2008	26	4,5	3/13	1/40	<5,0
	V7	4/3/2008	27	5,0	6/11	Nr	<5,0
D (2009)	V2	-	-	-	0/2	0/15	47,9
	V3	-	-	-	0/2	0/15	41,6
E	V2	4/2/2008	47	8,1	Nr	Nr	23,8
	V3	4/2/2008	47	7,9	2/2	1/7	12,0
F	V1	7/2/2008	50	5,5	0/2	1/6	9,6
	V2	7/2/2008	50	6,0	Nr	Nr	13,5
G (2008)	V2	3/3/2008	51	5,0	2/8	1/6	5,0
	V3	3/3/2008	51	5,0	10/14	5/17	3,26
G (2009)	V1	6/1/2009	29	4,5	0/4	3/17	65,0
	V2	6/1/2009	29	4,0	2/4	1/34	21,5

Nr, não realizado; -, sem ocorrência de mortalidade.

vírus permaneceu nos viveiros ou no ambiente externo das fazendas infectadas entre os ciclos de cultivo. Estudos relatam a detecção de WSSV, com taxas superiores a 10%, em amostras de viveiros infectados e em canais circunvizinhos, 20 meses após o surto da enfermidade (Quang et al., 2009).

As mortalidades nos viveiros afetados ocorreu entre 26 e 51 dias após o povoamento, e o peso dos camarões variou de 4,0 a 8,1 g. Nessas fazendas, foram observados camarões com coloração avermelhada, típica da mancha-branca, presença de camarões moribundos e mortos na lateral dos viveiros, presença de caranguejos mortos e aves alimentando-se de camarões mortos. O comportamento da enfermidade da mancha-branca, observado no presente trabalho, é semelhante ao descrito em *Litopenaeus vannamei* no Equador, onde a mortalidade geralmente ocorreu entre 30 a 40 dias após o povoamento, com mortalidade de 60 a 95% de 5 a 8 dias após a detecção dos sinais clínicos (Rodríguez et al., 2003). Pérez et al. (2005) sugerem que as pós-larvas podem ser a fonte inicial da carga viral, considerando-se também a possibilidade de aumento da doença ou mesmo de a fonte do vírus ocorrer em consequência de portadores positivos, que fazem parte do habitat ou da dieta normal dos camarões. A não detecção de WSSV, nas amostras de pós-larvas de diferentes origens, por PCR *nested*, e a utilização das mesmas pós-larvas por fazendas com e sem mortalidade pela mancha-branca indicam que as pós-larvas não devem ter sido a fonte de entrada de vírus nas fazendas.

Não foram encontradas diferenças significativas nos resultados das análises microscópicas a fresco dos camarões, entre os viveiros com e sem WSSV (Tabela 3). Foi observado maior percentual de amostras com graus de severidade de 0 a 2, nos parâmetros: presença de epicomensais nos pereiópodos, nas brânquias e nos pleópodos, presença de cianobactérias no intestino e canibalismo. Para os parâmetros condições do hepatopâncreas, presença de gregarinas e grau de estresse, observou-se maior percentual de amostras com graus de severidade de 2 a 4. Esses resultados indicam problemas de saúde nos camarões cultivados, em todas as fazendas analisadas, que podem ter influenciado as baixas sobrevivências (inferiores a 65%) das fazendas sem a presença de WSSV. Infecções severas de gregarinas podem produzir anomalias no epitélio e mucosa do

intestino médio, provocar perfurações e criar uma rota de entrada de bactérias oportunistas tipo vírios (Gómez-Gil et al., 2001). Além disso, alterações significativas no hepatopâncreas, como deformidades e baixo nível de lipídios, estão relacionadas a problemas nutricionais e presença de microrganismos patogênicos (Mendes et al., 2007).

O percentual de camarões, com presença de vírios na hemolinfa, foi de 14% para viveiros com WSSV, e de 12,8% para viveiros sem WSSV, e não houve diferenças significativas entre os viveiros com e sem WSSV. Há indicativos de que o processo da

**Tabela 3.** Percentual de amostras por grau de severidade, de presença de epicomensais nas brânquias, nos pereiópodos e nos pleópodos, ocorrência de canibalismo, presença de gregarinas e cianobactérias no conteúdo intestinal, condição de estresse e alterações do hepatopâncreas em viveiros sem (-) e com (+) ocorrência de mancha-branca (WSSV)<sup>(1)</sup>.

Parâmetros	Grau de severidade					n
	0	1	2	3	4	
<b>Brânquias</b>						
WSSV -	84,38	3,13	4,69	7,81	0	64
WSSV +	74,32	1,35	9,46	12,16	2,7	74
<b>Pereiópodos</b>						
WSSV -	41,54	10,77	13,85	26,15	7,69	65
WSSV +	53,73	1,49	19,4	13,43	11,94	36
<b>Pleópodos</b>						
WSSV -	33,85	3,08	21,54	26,15	15,38	65
WSSV +	59,09	1,52	13,64	18,18	7,58	66
<b>Canibalismo</b>						
WSSV -	69,35	1,61	19,35	3,23	6,45	62
WSSV +	62,50	0,00	21,88	12,50	3,13	64
<b>Gregarinas</b>						
WSSV -	43,0	1,5	17,0	15,4	23,1	65
WSSV +	52,0	0	13,8	24,6	9,6	65
<b>Cianobactérias</b>						
WSSV -	58,93	0	23,21	10,71	7,14	56
WSSV +	64,18	2,99	23,88	5,97	2,99	67
<b>Estresse<sup>(2)</sup></b>						
WSSV -	0	1,64	27,87	44,26	26,23	61
WSSV +	0	0	34,85	39,39	25,76	66
<b>Hepatopâncreas<sup>(3)</sup></b>						
WSSV -	0	0	41,27	33,33	25,4	63
WSSV +	0	0	24,62	46,15	29,23	65

<sup>(1)</sup>Não foram detectadas diferenças significativas entre viveiros com e sem WSSV, em todos os parâmetros, pelo teste de qui-quadrado, a 5% de probabilidade. Grau de severidade, escala de 0 a 4, segundo Lightner (1996) e Cuéllar-Anjel (2008). <sup>(2)</sup>Número total de amostras. <sup>(3)</sup>Grau de estresse avaliado, a partir da observação da coloração dos apêndices e expansão dos cromatóforos. <sup>(3)</sup>Alterações no hepatopâncreas, deformidades e baixo nível de lipídios.

enfermidade da mancha-branca aumenta muito pela presença de bactérias patogênicas ou oportunistas e por uma possível associação entre surtos de WSSV com a presença de vibrios luminescentes em *L. vannamei* (Horowitz & Horowitz, 2001).

O tempo médio de coagulação da hemolinfa, observado em viveiros com WSSV, foi de 36,25 s e, para viveiros sem WSSV, de 37,16 s, sem diferenças significativas entre os viveiros com o vírus e sem o vírus. Valores de tempo de coagulação da hemolinfa, superiores a 30 s indicam a existência de problemas na saúde dos camarões (Aguirre-Guzmán & Sánchez Martínez, 2005). O percentual de amostras com tempo de coagulação da hemolinfa superior a 30 s foi de 83%, para viveiros com WSSV, e de 72%, para viveiros sem WSSV, e pode ser reflexo dos elevados percentuais de infecção por gregarina e deformidades no hepatopâncreas, observados nas análises microscópicas a fresco.

Os intervalos de temperatura da água, das fazendas onde foi observada mortalidade pela mancha-branca, foram semelhantes aos das fazendas sem mortalidade, não tendo ocorrido oscilações bruscas diárias. A temperatura média diária da água das fazendas variou entre: 22,45 e 29,9°C na fazenda A; 22,94 e 29,99°C, na fazenda B; 19,17 e 30,10°C, na fazenda C; 19,70 e 29,64°C, na fazenda D; 23,19 e 30,51°C, nas fazendas E e F; 22,85 e 29,87°C, na fazenda G, safra 2008; e 21,21 e 29,85°C, na fazenda G, safra 2009. As temperaturas, no dia de início da mortalidade, situaram-se entre: 26,25 e 28,57°C, fazenda C; 24,6 e 27,6°C, fazendas E e F; 27,20 e 29,29°C, fazenda G, safra 2008; e 25,07 e 26,6°C, fazenda G, safra 2009. Em todas as fazendas, a mortalidade ocorreu em períodos de elevação da temperatura da água (Figura 1). A elevação na temperatura da água também se relacionou ao aumento da mortalidade de *L. vannamei* infectados experimentalmente com WSSV (Sonnenholzner & Rodríguez, 2002).

As temperaturas observadas nos períodos de mortalidade estão dentro do intervalo de oscilação diária de 26 a 30°C, registrado em ocorrências de mortalidades em cultivos no México, em 2007 (Centro de Investigaciones Biológicas del Nordeste, 2008).

Na análise dos parâmetros físico-químicos da água, foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de alcalinidade, fenol, nitrito e sílica, entre os viveiros com e sem WSSV, não tendo

ocorrido diferenças para os parâmetros amônia, ferro, pH, nitrato, ortofosfato, salinidade e sulfeto (Tabela 4).

Para os parâmetros físico-químicos do solo, foram encontradas diferenças significativas nos valores do pH entre viveiros com e sem WSSV, e não houve diferenças entre as concentrações de alumínio, amônia, ferro, ortofosfato, fenol, sulfeto e matéria orgânica.

As concentrações de nitrito e sílica na água e o pH do solo estão dentro ou muito próximos aos limites considerados adequados para o cultivo de camarões (Boyd, 2001) e, possivelmente, não tiveram papel relevante na manifestação da enfermidade da mancha-branca.

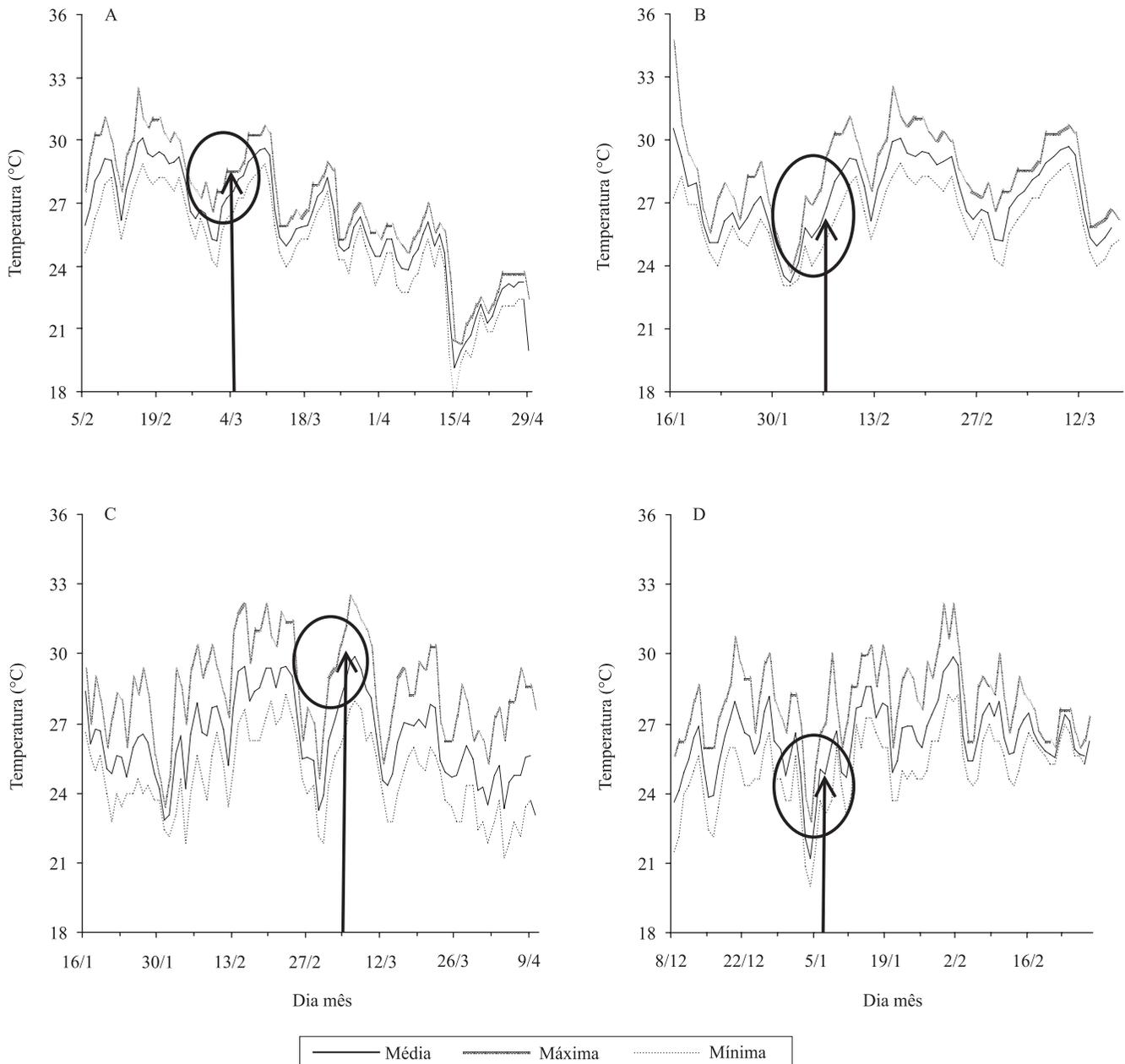
A alcalinidade está diretamente relacionada a fatores importantes durante o cultivo de camarões como o efeito tampão e a variação diária do pH da água, a produtividade dos viveiros, a toxicidade de metais (Boyd & Tucker, 1998) e a ecdise dos camarões (Chanratchakool, 2003). Não foram encontrados estudos que relacionassem a manifestação da mancha-branca a valores de alcalinidade em camarões cultivados. Os valores de alcalinidade estiveram abaixo dos limites recomendados por Boyd (2001) para o cultivo de camarões (100 mg L<sup>-1</sup>), em 70,4 % das amostras nos viveiros com WSSV, e em 38,34% das amostras nos viveiros sem WSSV, e podem ter influenciado direta ou indiretamente esses resultados.

Os fenôis em ambientes aquáticos podem ocorrer naturalmente, pela decomposição de vegetação aquática, ou pela introdução, por efluentes industriais e esgoto doméstico, ou podem ser formados pela degradação de certos pesticidas no solo (Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999). A água de abastecimento das fazendas de camarões, onde foram verificados os maiores valores de fenol, é captada do Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina, que apresenta forte comprometimento em consequência da poluição decorrente da extração de carvão, efluentes industriais, esgoto doméstico, agrotóxicos e dejetos de suínos (Muñoz Espinosa, 2001).

Não foram encontrados relatos sobre a toxicidade do fenol a camarões peneídeos, no entanto, para o camarão *Crangon septemspinosa* e o molusco *Mya arenaria* expostos à concentração de 7,5 mg L<sup>-1</sup> de fenol, o tempo letal médio (LT 50) foi de 21 horas

(McLeese et al., 1979). Boyd & Tucker (1998) incluem o fenol entre os produtos químicos com risco de contaminar viveiros de cultivo, com concentração letal média (LC 50) de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , em um tempo de exposição de 96 horas, sem mencionar a espécie. Alguns valores de fenol encontrados estão próximos aos limites anteriormente citados, principalmente nas fazendas E e F ( $6,97$  e  $6,55 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente).

Essas fazendas estão localizadas em uma região próxima a áreas de plantio de arroz e têm solo de turfa nos seus viveiros, o que poderia ser uma fonte de fenol. As concentrações de fenol encontradas no presente trabalho podem não ter atingido níveis letais, mas níveis sub-letais, suficientes para causar estresse nos camarões e provocar o surgimento da enfermidade da mancha-branca.



**Figura 1.** Temperaturas máxima, média e mínima da água dos viveiros por fazenda (A, fazenda C; B, fazendas E e F; C, fazenda G 2008 e D, fazenda G 2009), com a indicação da data de início da manifestação da mancha-branca.

**Tabela 4.** Parâmetros físicos e químicos da água e do solo, em viveiros com e sem ocorrência da mancha-branca (WSSV)<sup>(1)</sup>.

Parâmetro	Viveiros com WSSV	Viveiros sem WSSV	
		Água	
Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> )	88,35±23,76a		119,76±48,52b
Salinidade (‰)	13,73±3,72a		12,93±5,33a
Amônia (mg L <sup>-1</sup> )	0,61±0,65a		0,84±1,22a
Fenol (mg L <sup>-1</sup> )	2,95±1,90a		2,06±1,28b
Ferro (mg L <sup>-1</sup> )	0,29±0,24a		0,26±0,19a
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	0,16±0,47a		0,10±0,17a
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	0,03±0,05a		0,02±0,02b
Ortofosfato (mg L <sup>-1</sup> )	0,38±0,36a		0,34±0,30a
pH	7,86±0,41a		7,91±0,55a
Sulfeto (mg L <sup>-1</sup> )	0,03±0,04a		0,03±0,03a
Silica (mg L <sup>-1</sup> )	0,87±0,73a		1,09±0,55b
		Solo	
Alumínio (mg L <sup>-1</sup> )	0,55±0,40a		0,55±0,35a
Amônia (mg L <sup>-1</sup> )	1,60±1,50a		1,51±1,33a
Fenol (mg L <sup>-1</sup> )	0,49±0,42a		0,64±0,61a
Ferro (mg L <sup>-1</sup> )	1,11±1,25a		0,82±0,52a
Matéria orgânica (%)	3,84±5,98a		3,26±3,13a
Otofosfato (mg L <sup>-1</sup> )	1,07±0,95a		1,26±0,91a
pH	7,68±0,36a		8,04±0,43b
Sulfeto (mg L <sup>-1</sup> )	0,06±0,06a		0,07±0,04a

<sup>(1)</sup>Médias±desvio-padrão, seguidas de letras iguais, não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney e teste “Z” (salinidade e pH solo), a 5% de probabilidade.

## Conclusões

1. Fazendas de camarões, com histórico recente de ocorrência da enfermidade da mancha-branca, têm maiores riscos de incidência de surtos.

2. A variação na temperatura da água dos viveiros entre 24,6 e 29,29°C favorece a manifestação da enfermidade da mancha-branca em camarões *Litopenaeus vannamei*.

3. Viveiros de camarões *Litopenaeus vannamei*, com elevadas concentrações de fenol e baixa alcalinidade da água, têm maior ocorrência da enfermidade da mancha-branca.

## Referências

AGUIRRE-GUSZMÁN, G.; SÁNCHEZ MARTÍNEZ, G. Análisis en fresco de camarón, un proceso rápido para el diagnóstico presuntivo de enfermedades. *Panorama Acuicola Magazine*, v.19, p.59-65, 2005.

ALFAKIT. *Referências - metodologias de análise colorimétricas*. Florianópolis, 2007. 5p. Disponível em: <www.alfakit.com.br/fmanager/alfakit/metodologia/metodologias.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2008.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21<sup>st</sup> ed. Washington: APHA, 2005.

BOYD, C.E. Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón. In: HAWS, M.C.; BOYD, C.E. (Ed.). *Métodos para mejorar la camaronicultura en Centroamérica*. Managua: Imprenta UCA, 2001. p.1-30.

BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. *Pond aquaculture water quality management*. Boston: Kluwer Academic, 1998. 700p.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. *Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life*: phenols, mono- and dihydric phenols.. Winnipeg: CCME, 1999. 5p. (Canadian environmental quality guidelines). Disponível em: <ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/204/>. Acesso em: 19 dez. 2009.

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NORDESTE. *Resumen ejecutivo del informe final del proyecto Programa Integral de Sanidad Acuicola en Camarón*. La Paz: CIBNOR, 2008. 33p.

CHANRATCHAKOOL, P. Problems in shrimp culture during the wet season. *Aquaculture Asia*, v.8, p.38-39, 2003.

CORSIN, F.; TURNBULL, J.F.; HAO, N.V.; MOHAN, C.V.; PHI, T.T.; PHUOC, L.H.; TINH, N.T.N.; MORGAN, K.L. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice-shrimp farming system. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.47, p.1-12, 2001.

COSTA, S.W. Aquicultura no Estado de Santa Catarina: situação atual e perspectivas. *Revista da ABCC*, v.12, p.49-50, 2010.

CUÉLLAR-ANJEL, J. Métodos de diagnóstico de enfermedades en camarones marinos de cultivo. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL (Ed.). *Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos: programa CYTED Red II-D Vannamei*. Panamá: New Concept Publications, 2008. p.15-54.

FEGAN, D.F.; CLIFFORD III, H.C. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP CULTURE, AQUACULTURE, 2001, Baton Rouge. *Proceedings*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2001. p.168-198.

GÓMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; GUERRA-FLORES, A. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: PÁEZ-OSUNA, F. (Ed.). *Camaronicultura y medio ambiente*. México: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, 2001. p.273-274.

HOROWITZ, A.; HOROWITZ, S. Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective. In: SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP CULTURE, AQUACULTURE, 2001, Baton Rouge. *Proceedings*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2001. p.199-218.

KAUTSKY, N.; RONNBACK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, v.191, p.145-161, 2000.

LIGHTNER, D.V. *Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996. 304p.

- LIGHTNER, D.V. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.36, p.229-248, 2005.
- LO, C.-F.; LEI, J.-H.; HO, C.-H.; CHEN, C.-H.; PENG, S.-E.; CHEN, Y.-T.; CHOU, C.-M.; YEH, P.-Y.; HUANG, C.-J.; CHOU, H.-Y.; WANG, C.-H.; KOU, G.-H. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.25, p.133-141, 1996.
- LO, C.-F.; PENG, S.-E.; CHANG, Y.-S.; KOU, G.-H. White spot syndrome - what we have learned about the virus and then disease. In: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE, 5., 2005, Manila. **Proceedings**. Manila: Asian Fisheries Society, 2005. p.421-433.
- MARQUES, J.S. **Contribuição para o monitoramento do vírus da síndrome da mancha-branca na carcinicultura de Santa Catarina**. 2008. 51p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- MACLEESE, D.W.; ZITKO, V.; PETERSON, M.R. Structure-lethality relationships for phenols, anilines and other aromatic compounds in shrimp and clams. **Chemosphere**, v.8, p.53-57, 1979.
- MENDES, E.S.; BARRETO, A.C.G.; GÓES, L.M.N.B.; GUIMARÃES, J.M.; NASCIMENTO, D.L.; DINIZ FILHO, R.S.; MENDES, P.P. Avaliação do exame a fresco em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) associado à contagem e identificação de *Vibrio* spp. em água de cultivo. **Medicina Veterinária**, v.1, p.7-15, 2007.
- MUÑOZ ESPINOSA, H.R. Impactos e conflitos na gestão de recursos hídricos do sul de Santa Catarina, Brasil. In: ENCUESTRO DE LAS AGUAS – AGUA, VIDA Y DESARROLLO, 3., 2001, Santiago. **Analisis**. Santiago: Instituto Interamericano de Capacitación Agrícola, 2001. Disponible en: <[www.aguabolivia.org/situacionaguaX/IIIEncAguas/contenido/trabajos\\_azul/TC-049.htm](http://www.aguabolivia.org/situacionaguaX/IIIEncAguas/contenido/trabajos_azul/TC-049.htm)>. Leído el: 10 jan. 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Organização mundial de saúde animal [home page]**. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/en\\_index.htm](http://www.oie.int/eng/en_index.htm)>. Acesso em: 02 dez. 2010.
- PEINADO-GUEVARA, L.I.; LÓPEZ-MEYER, M. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. **Aquaculture**, v.251, p.33-45, 2006.
- PÉREZ, F.; VOLCKAERT, F.A.M.; CALDERON, J. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**, v.250, p.586-591, 2005.
- QUANG, N.D.; HOA, P.T.P.; DA, T.T.; ANH, P.H. Persistence of white spot syndrome virus in shrimp ponds and surrounding areas after an outbreak. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.156, p.69-72, 2009.
- RODRÍGUEZ, J.; BAYOT, B.; AMANO, Y.; PANCHANA, F.; BLAS, I.; ALDAY, V.; CALDERON, J. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. **Journal of Fish Diseases**, v.26, p.439-450, 2003.
- SEIFFERT, W.; COSTA, S.W.; MAGGIONI, D. A mancha-branca em Santa Catarina. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.15, p.51-53, 2005.
- SONNENHOLZNER, S.; RODRÍGUEZ, J.; CALDERON, J. Temperature and WSSV: CENAIM studies promising shrimp culture technique. **Global Aquaculture Advocate**, v.5, p.55-57, 2002.
- SOUZA, T.M. **Deteção do vírus da mancha-branca (WSSV) em *Litopenaeus vannamei* por métodos de diagnósticos moleculares: hibridização in situ e PCR em tempo real**. 2008. 46p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- WONGTEERASUPAYA, C.; VICKERS, J.E.; SRIURAIRATANA, S.; NASH, G.L.; AKARAJAMORN, A.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; TASSANAKAJON, A.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; FLEGEL, T.W. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.21, p.69-77, 1995.

---

Recebido em 22 de julho de 2010 e aprovado em 11 de novembro de 2010