

NOTA CIENTÍFICA

USO DE ANTIBIÓTICOS NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE
Crassostrea rhizophorae PARA UTILIZAÇÃO EM TESTES DE
ECOTOXICIDADE

Clovis Lira da Rocha Jr.¹, Lisandra Maria Barroso Matos², Daniela Bezerra Boaes², Ricardo Luvizotto Santos^{3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão. Av. dos Portugueses, 1966, Campus Dom Delgado, São Luís, MA, Brasil. CEP 65080-805.

² Laboratório de Ecotoxicologia. Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Maranhão. Av. dos Portugueses, 1966, Campus Dom Delgado, São Luís, MA, Brasil. CEP 65080-805.

³ Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Maranhão. Av. dos Portugueses, 1966, Campus Dom Delgado, São Luís, MA. CEP 65080-805.

* Autor correspondente: luvizottosantos@ufma.br

RESUMO

A contaminação bacteriana na larvicultura de ostras pode resultar em número insuficiente de embriões para uso em ensaios embriolarvais. O uso profilático de uma mistura de antibióticos (amoxicilina 25 µg/mL, cefalexina 25 µg/mL, nitrofurantoína 125 µg/mL e cloranfenicol 25 µg/mL) foi testado durante o cultivo de embriões de ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*. As concentrações mais elevadas da mistura de antibióticos (1,0 e 0,5 µL/mL) foram tóxicas para os embriões. A concentração de 0,0625 µL/mL de solução da mistura de antibióticos no meio de cultivo não afetou o desenvolvimento normal dos ovos permitindo a produção de um número satisfatório de embriões em estágio de mórula em meio livre de bactérias.

Palavras-chave: ecotoxicologia, ensaio embrio-larval, ostra-do-mangue.

Abstract

Use of antibiotics in the production of *Crassostrea rhizophorae* embryos for use in ecotoxicity tests

Use of antibiotics in the production of *Crassostrea rhizophorae* embryos for use in ecotoxicity tests. Bacterial contamination in oyster hatchery may result in insufficient number of embryos to be used in early-life stage toxicity test. Prophylactic use of a mixture of antibiotics (amoxicillin 25 µg/mL, cephalexin 25 µg/mL, nitrofurantoin 125 µg/mL and chloramphenicol 25 µg/mL) was tested during hatchery of *Crassostrea rhizophorae*. High concentrations of the antibiotic mixture (1.0 and 0.5 µL/mL) were toxic to the embryos. The concentration of 0.0625 µL/mL of the antibiotic mixture in culture water did not affect the normal development of oyster eggs allowing the production of a satisfactory number of embryos at morula stage, free of bacterial contamination.

Keywords: Ecotoxicology, early-life stage test, mangrove oyster.

No Brasil, as regiões litorâneas ou próximas ao litoral abrigam as maiores densidades demográficas, e os efeitos dessa ocupação podem ser percebidos nos ecossistemas marinhos adjacentes. Além disso, a maioria dos portos brasileiros se encontra em áreas costeiras estuarinas (Brasil, 1991) e nessas regiões é comum a presença de agentes potencialmente tóxicos gerados pelas atividades portuárias (e industriais) que se somam aos aportes continentais via bacia de drenagem (Marques *et al.*, 2011). Estes agentes incluem derivados de petróleo, produtos da queima de combustíveis, pesticidas, compostos orgânicos persistentes, metais pesados, entre outros (Walker

et al., 2003; Geffard *et al.*, 2003; Siqueira, 2008; Marques *et al.*, 2011). Desse modo, desenvolver ações de monitoramento e controle da poluição aquática é uma necessidade premente nessas áreas visando a conservação dos recursos vivos e a manutenção das atividades socialmente importantes como a pesca (Islam e Tanaka, 2004; Magris *et al.*, 2006). Nesse contexto, a ecotoxicologia é uma importante ferramenta para a avaliação ambiental, e o desenvolvimento de protocolos de ensaios com organismos-teste da fauna e flora locais tem recebido a atenção de pesquisadores brasileiros.

Os estágios iniciais do desenvolvimento

ontogenético de ostras representam numa fase crítica para o organismo por serem sensíveis a diversos estressores ambientais. Nesse sentido, a espécie *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) tem sido utilizada em ensaios embrio-larvais devido a sua sensibilidade frente à toxicidade de amostras ambientais (Zagatto e Bertolotti, 2008). De fato, o estudo da embriotoxicidade em ostras do gênero *Crassostrea* é reconhecido como um dos mais sensíveis dentre os bioensaios (Stebbing *et al.*, 1980; Geffard *et al.*, 2003), sendo indicado para o monitoramento das regiões costeiras (His *et al.*, 1999).

Para estes ensaios embrio-larvais é necessária a reprodução *in vitro* a qual está sujeita à contaminação bacteriana. A competição interespecífica e a predação causada por microrganismos indesejáveis impossibilitam a obtenção do número suficiente de embriões para a montagem dos ensaios (Jeffries, 1982; Elston, 1984). Segundo Miranda e Guzenski (1999) os cultivos de *C. rhizophorae* são mais suscetíveis à contaminação por bactérias que outras espécies devido à falta de tecnologias de reprodução amplamente difundidas.

Bactérias dos gêneros *Vibrio* e *Pseudomonas* são os patógenos mais frequentes nas larviculturas de moluscos (Lodeiros *et al.*, 1998; Campa-Córdova *et al.*, 2005) e o uso de antibióticos como o cloranfenicol (FIPERJ 1997, Zayas *et al.*, 1995), estreptomomicina ou tetraciclina (Pereira, 1997) tem sido recomendado como medida profilática. Entretanto, os princípios ativos mais eficientes e as concentrações seguras ainda não são conhecidos para a ostra nativa *C. rhizophorae*.

Visando estabelecer um protocolo de profilaxia contra contaminação bacteriana, avaliou-se a utilização de uma solução contendo uma mistura de quatro formulações comerciais de antibióticos (amoxicilina, cefalexina, nitrofurantoina e cloranfenicol) a fim de determinar a eficiência na obtenção de embriões em estágio de mórula de *C. rhizophorae*.

Em estudo preliminar, diferentes bancos de ostras foram visitados na Ilha do Maranhão (Nordeste do Brasil) considerando a distância de fontes poluidoras e aspectos logísticos como a facilidade de acesso e abundância de indivíduos com características morfológicas semelhantes. Lopes (2016) através da identificação molecular de ostras nativas em sete municípios do estado do Maranhão utilizando o gene COI, constatou a ocorrência das espécies *Crassostrea gasar* e *C. rhizophorae* ao

longo do litoral maranhense. De fato, nos bancos de ostras visitados foram identificados 2 grupos com características morfológicas distintas, principalmente em relação ao tamanho, formato e coloração das valvas. Estes exemplares foram coletados e separados em dois grupos fenotípicos (grupo 1 e grupo 2). Em seguida, foram levados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGem) do DEBIO-UFMA onde o grupo 1 foi identificado com *C. gasar* através do método do *DNA barcoding* (Herbert *et al.*, 2003; dados não publicados) para 100% dos indivíduos analisados. Dessa forma, por exclusão, considerou-se que o grupo 2 era constituído por exemplares de *C. rhizophorae*. Com base nesses resultados, utilizamos somente ostras oriundas do banco localizado no Carimã (Raposa, MA) cujos indivíduos apresentavam o mesmo fenótipo comum ao grupo 2 desse estudo preliminar.

Para os ensaios, foram preparados meios de cultivo com água marinha coletada em área distante da zona urbana da Ilha do Maranhão (Carimã, Raposa, MA) ajustada à salinidade 20 g/kg, pH 8,0 e temperatura de 25°C. Em frascos de vidro contendo 10 mL de meio de cultivo, foram adicionados aproximadamente 1.000 embriões/mL obtidos através de fertilização *in vitro* de óvulos maduros e espermatozoides na proporção de 1:30 extraídos com auxílio de uma pipeta de vidro de adultos coletados na mesma área. A contagem de gametas e embriões foi feita em câmara de Neubauer.

Uma solução estoque (SE) contendo quatro antibióticos foi preparada em água marinha tratada: amoxicilina 25 µg/mL, cefalexina 25 µg/mL, nitrofurantoína 125 µg/mL e cloranfenicol 25 µg/mL. Foram adicionadas diferentes alíquotas dessa SE aos meios de cultivo resultando nas concentrações: 1,0; 0,5; 0,125 e 0,0625 µL por mL de meio de cultivo. Ademais, dois grupos controle foram preparados simultaneamente sendo um contendo somente água salinidade 20 (controle negativo) e outro contendo uma solução de 1,0 µg/mL de dodecil sulfato de sódio (DSS) (controle positivo). Todos os tratamentos foram preparados em triplicata.

Após 20 minutos de exposição, amostras dos diferentes meios foram coletadas e fixadas com formaldeído 4%. Em seguida, os embriões foram quantificados e classificados quanto ao seu desenvolvimento da seguinte forma: 0 - óvulo não fecundado, em forma de pera ou arredondado; 1 - membrana celular em fase de granulação; 2 - granulação da membrana com formação do corpo hemisférico; e 3 - clivagens iniciadas com duas ou mais células (Figura 1).

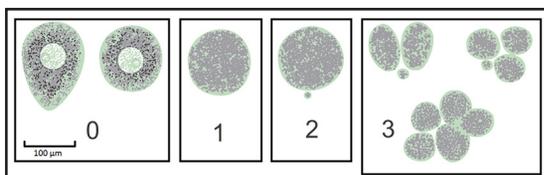


Figura 1. Estágios iniciais do desenvolvimento de embriões de *C. rhizophorae*.

Os percentuais médios de cada classe do desenvolvimento embrionário foram representados através de um gráfico de sobreposição de barras (Figura 2). As médias quanto aos percentuais de embriões contabilizados na fase 3 foram comparadas utilizando teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) (Figura 3).

No controle negativo, foram obtidos em média 500 embriões/mL, enquanto que no controle positivo houve diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de embriões classe 3 com média de 208 embriões/mL. As soluções mais concentradas de antibióticos (1,0 e

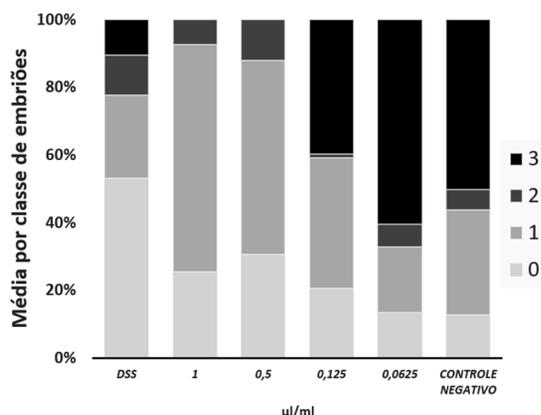


Figura 2. Percentual médio para as classes de embriões de *C. rhizophorae* ao final do tratamento com diferentes concentrações da mistura de antibióticos e controles positivo (DSS) e negativo.

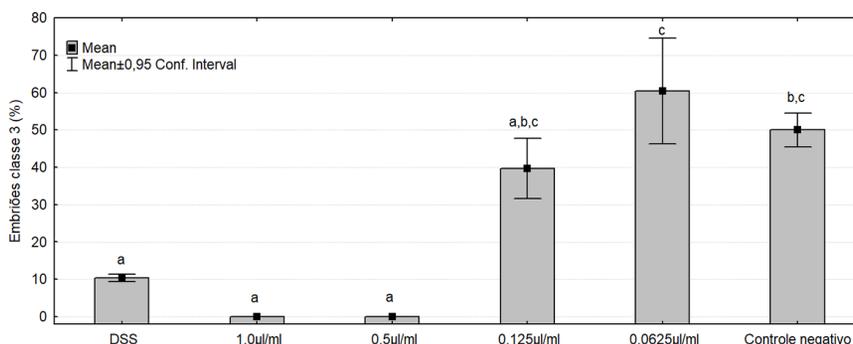


Figura 3. Percentagem média de embriões de *C. rhizophorae* na classe 3 nas diferentes concentrações da mistura de antibióticos e controles positivo (DSS) e negativo (média \pm intervalo de confiança 95%). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre si (Kruskal-Wallis, $H_{crit} = 16,7$; $p < 0,05$).

0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) não permitiram a produção de embriões no estágio 3, indicando que nestas concentrações os antibióticos apresentaram toxicidade elevada. As soluções de antibióticos de 0,125 e 0,0625 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentaram média de embriões no estágio 3 semelhante à observada no grupo controle negativo ($p > 0,05$), com valores de 400 e 604 embriões/mL, respectivamente.

Sabe-se que algumas condições, tais como densidade larval, temperatura, período sazonal, adição de alimento, flora bacteriana das matrizes e dos equipamentos utilizados no manejo favorecem o aparecimento de bactérias nos cultivos *in vitro*, sendo muitas delas patogênicas (Walne, 1958; Jeathon *et al.*, 1988; Lemos *et al.*, 1994; Wassnig e Southgate, 2011; Brandão *et al.*, 2017). A proliferação de patógenos oportunistas pode levar ao surgimento de doenças, desenvolvimento anormal das larvas e até mortalidade (Fitt *et al.*, 1992; Uriarte *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2005) inviabilizando os cultivos tanto para a produção de sementes para a ostreicultura, quanto para a obtenção de embriões para ensaios ecotoxicológicos. Dessa forma, o tratamento com antibióticos é uma alternativa para garantir o sucesso no desenvolvimento dos embriões e obtenção de número suficiente de larvas. De fato, Miranda e Guzinski (1999) compararam um tratamento sem nenhum antibiótico com outro utilizando a combinação de 0,8 ppm de nitrofurazona e 0,8 ppm de cloranfenicol durante 24 dias. Como resultado, observaram mortalidade total no tratamento sem antibiótico, enquanto o tratamento com antibióticos apresentou crescimento normal e sobrevivência de 36 % dos embriões. Zays *et al.*, (1995) também verificaram que 0,2 mg/L de cloranfenicol elevou a sobrevivência larval do cultivo experimental em até 47 %.

O uso de antibióticos na larvicultura de moluscos é ainda um assunto bastante controverso. Se por um lado eles são capazes de garantir a sobrevivência larval nos cultivos, por outro lado podem retardar o crescimento ou ainda produzir bactérias mais resistentes (Miranda e Guzinski, 1999). Entretanto, Elston (1984) ressalta que o controle da proliferação de bactérias é ponto crítico para o sucesso de uma larvicultura, e que apesar de todo cuidado que se tenha nas etapas da obtenção das sementes, a microflora presente nos reprodutores é uma das principais fontes de bactérias e podem ser introduzidas na larvicultura durante a retirada dos gametas para a fertilização *in vitro*.

Variações na qualidade do meio onde está instalado o cultivo influenciam no desenvolvimento de patógenos e sua sensibilidade aos antibióticos. Em estudo utilizando representantes patogênicos da flora microbiológica presente em ostras, Brandão *et al.* (2017) observaram diferentes suscetibilidades das bactérias aos antibióticos pela quantificação dos genes de resistência (bla_{TEM} , bla_{SHV} e bla_{KPC}) via PCR em DNA em relação ao aumento de *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus* em períodos sazonais diferentes. Dessa forma, o uso de antibióticos na larvicultura de *C. rhizophorae* é um procedimento que vem sendo adotado em alguns laboratórios, sendo o cloranfenicol um dos antibióticos mais utilizados como medida profilática (FIPERJ, 1997).

Neste estudo, o uso de cloranfenicol em associação com outros antibióticos (amoxicilina, cefalexina e nitrofurantoina) na concentração de 0,0625µl da mistura por mL de meio de cultivo não afetou o desenvolvimento dos ovos de *C. rhizophorae* permitindo a produção de um número satisfatório de embriões no estágio 3 (mórula com clivagens iniciadas com duas ou mais células) em meio livre de bactérias, sendo que este protocolo passou a ser incorporado nos procedimentos de preparação de ensaios embrio-larvais com a ostra do mangue *C. rhizophorae* no Laboratório de Ecotoxicologia da UFMA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRANDÃO, M.A.R., LOPES, A.T.S., NETA, M.T.S., OLIVEIRA, R.B.F., REZENDE, R.P., ALBUQUERQUE, G.R., GONÇALVES, V.D., RODRIGUES, D.P., BOEHS, G. & MECIEL, B. M. 2017. Microbiological quality and prevalence of β -lactam antibiotic resistance genes in oysters (*Crassostrea rhizophorae*). J. Food. Prot., 80(3): 488-496.
- BRASIL. 1991. Comissão Interministerial (CIMA) para a preparação da Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (CNUMAD). Subsídios técnicos para elaboração do Relatório Nacional do Brasil para a CNUMAD. Brasília. 172 p.
- CAMPA-CÓRDOVA, A.I., LUNA-GONZALÉZ, A., ZARAIAN-HERZBERG, M., CÁCERES-MARTINEZ, C.J., 2005. Prophylactic use of antibiotics in larval culture of *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1835). J. Shellfish Res., 24(4): 923-930.
- ELSTON, R.A. 1984. Prevention and management of infectious diseases in Intensive mollusc husbandry. J. World Maricul. Soc., 15(1-4): 284-300.
- FIPERJ. 1997. Reprodução e cultivo da ostra de mangue (*Crassostrea rhizophorae*). FIPERJ, Rio de Janeiro. 4 p.
- FITT, W.K., HESLINGA, G.A. & WATSON, T.C. 1992. Use of antibiotics in the mariculture of giant clams. Aquaculture, 104(1-2):1-10.
- GEFFARD, O., GEFFARD, A., HIS, E. & BUDZINSKI, H. 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. Mar. Pol. Bull., 46(4): 481-490.
- HEBERT, P.D., RATNASINGHAM, S., & de WAARD, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270 (Suppl 1), S96-S99.
- HIS, E., HEYYANG, I., GEFFARD, O. & MONTAUDOUIN, X. 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. Water Res., 33(7): 1706- 1718.
- ISLAM, M.S. & TANAKA, M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. Mar. Pollut. Bull., 48(7-8): 624-49.
- JEATHON, C., PRIEUR, D., & COCHARD, J.C. 1988. Bacteriological survey of antibiotic-treated seawaters in a *Pecten maximus* hatchery. Aquaculture, 71(1-2): 1-8.

- JEFFRIES, V.E. 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 29(3-4): 201-226.
- LEMONS, M.B.N., NASCIMENTO, I.A., ARAÚJO, M.M.S., PEREIRA, S.A., BAHIA, I. & SMITH, D. 1994. The combined effects of salinity, temperature, antibiotic and aeration on larval growth and survival of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*. *J. Shellfish Res.*, 13(1): 187-192.
- LODEIROS, C.J., RENGELA, J.J., FREITESA, L., MORALES, F. & HIMMELMAND, J.H. 1998. Growth and survival of the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* maintained in suspended culture at three depths. *Aquaculture*, 165(1-2): 41-50.
- LOPES, R.G.P.S. 2016. Identificação molecular de ostras nativas do maranhão utilizando o gene COI. Dissertação de mestrado, UEMA, São Luís, MA. Disponível em: https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=3444402.
- MAGRIS, R.A., PASSAMANI, F., BINDA F.P. & LOUREIRO FERNANDES, L. 2006. Utilização de testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) para avaliação da eficiência de uma estação de tratamento de esgotos de Vitória (ES). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1(1): 49-52.
- MARQUES, J.S.J., RANGEL, T.P., BRITO, F.P., ALMEIDA, M.G., SALOMÃO, M.S.M.B., GOBO, A.A.R., SOUZA-SANTOS, L.P., ARAÚJI-CASTRO, C.M.V., COSTA, M.F. & REZENDE, C.E. 2011. Geoquímica de metais em sedimentos da zona estuarina do Complexo Industrial Porto de Suape, PE – Brasil. *Revista da Gestão Costeira Integrada*, 11(4): 379-387.
- MIRANDA, M.B.B. & GUZENSKI, J. 1999. Cultivo larval da ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), em diferentes condições de temperatura, salinidade e densidade. *Arq. Ciên. Mar.*, 32(1-2): 73-84.
- PEREIRA, C.C. 1997. Cultivo de ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae*) em Cuba. Ed. Informe Técnico del Ministerio de la Industria Pesquera, Havana. 8 p.
- PRADO, S., ROMALDE J.L., MONTES, J. & BARJA, J. L. 2005. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Dis. Aquat. Organ.*, 67(3): 209-15.
- SIQUEIRA, F.L.K. 2008. Avaliação do sistema de cultivo de ostra do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) no estuário do rio Vaza-Barris (Sergipe). Dissertação de Mestrado, UNIT, Aracajú, SE. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp060363.pdf>.
- STEBBING, A.R.D., AKESSON, B., CALABRESE, A., GENTILE, J.H., JENSEN, A. & LLOYD, R. 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapports et Proc es-verbaux des Reunions du Conseil International Permanent pour la Exploitation de la Mer.*, 179, 322–332.
- URIARTE, I., FARIÁS, A. & CASTILLA, J.C. 2001. Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquacul. Eng.*, 25(3): 139-147.
- WALKER, C.H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M. & PEAKAL, D.B. 2003. *Principles of Ecotoxicology*. 2nd Ed. Ed. CRC Press, Nova York, NY. 326p.
- WALNE P. R. 1958. The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of *Ostrea edulis* (L.). *J. Mar. Biol. Assoc.*, 37(2): 415-425.
- WASSNIG, M. & SOUTHGATE, P.C. 2011. The effects of egg stocking density and antibiotic treatment on survival and development of winged pearl oyster (*Pteria Penguin*, Röding 1798) embryos. *J. Shellfish Res.*, 30(1): 103-107.
- ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. 2008. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. Ed. RiMa. São Carlos, SP.
- ZAYAS, L.F., ORTIZ, J.L. & HERRERA, A.R. 1995. Nuevas perincias em el cultivo artificial del ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae*). Informe Técnico, p. 8-9.