

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAÍS MONTEIRO FERREIRA

**PESQUISA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO* EM ÁGUAS DO BALNEÁRIO
PONTAL DO SUL, LITORAL DO PARANÁ - PR**

UFPR - Centro de Estudos do Mar
BIBLIOTECA

PONTAL DO PARANÁ

2013

3
PV000593594

THAÍS MONTEIRO FERREIRA

**PESQUISA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO* EM ÁGUAS DO BALNEÁRIO
PONTAL DO SUL, LITORAL DO PARANÁ - PR**

Monografia apresentada como requisito parcial à conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura, Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Terra.

Orientadora: Luciene Corrêa Lima

UFPR - Centro de Estudos do Mar
BIBLIOTECA

PONTAL DO PARANÁ

2013

M
2013-02

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SIBI - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar

F383p Ferreira, Thaís Monteiro
Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em águas do balneário Pontal do Sul,
litoral do Paraná. / Thaís Monteiro Ferreira. – Pontal do Paraná, 2013.
33f.; 29 cm.

Orientador: Profa. Luciene Corrêa Lima.

Monografia (graduação) – Curso de Tecnologia em Aquicultura, Centro de
Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. *Vibrio* spp. 2. Vibriose. 3. Sanidade aquícola. 4. Bacteriologia. I. Título. II.
Luciene Corrêa Lima. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 589.9



CURSO TECNOLOGIA EM AQUICULTURA

Centro de Estudos do Mar

Setor de Ciências da Terra

Universidade Federal do Paraná

Avn. Beira-mar, s/nº - Pontal do Sul - Pontal do Paraná - Paraná - Brasil

CEP 83255-000 - Cx. Postal 50002

Tel. +55 (41) 3511 8644

E-mail : aquicultura@ufpr.br

TERMO DE APROVAÇÃO

Thais Monteiro Ferreira

QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO VIBRIO EM PONTAL DO SUL, LITORAL DO PARANÁ - PR

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do grau de Tecnólogo em Aqüicultura, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Dr.ª. Luciene Correa Lima
Orientadora e Presidente

Dr. Carlos Eduardo Belz
Membro Examinador

Dr. Luiz Laurenno Mafra Junior
Membro Examinador

Pontal do Paraná, 27/06/2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela existência, por me proporcionar a oportunidade de aumentar meus conhecimentos e me dar coragem para sempre seguir em frente à caminhada.

Aos meus pais Antonio Luiz e Eliana, que sempre serão minha inspiração e meus maiores incentivadores, e acreditam no meu potencial.

Ao meu irmão e amigo Diego, pelo apoio, carinho e dedicação, estando sempre pronto a me ajudar.

Aos meus avós Manoel e Tereza pela torcida e apoio em todos os momentos.

A professora Luciene Lima, que aceitou ser minha orientadora e dar a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, disponibilizar o material necessário para a realização do experimento, pela ajuda no desenvolvimento e na finalização do trabalho.

A técnica de laboratório Daniele Conceição por dividir seu conhecimento, me ajudar e apoiar no experimento e nos momentos delicados no decorrer do mesmo.

A professora Hedda E. Kolm, por disponibilizar o uso do laboratório e de equipamentos; e a técnica de laboratório Fernanda que esteve pronta em ajudar quando necessário.

Aos alunos do Laboratório de Sanidade Aquícola CEM – UFPR pela colaboração.

A Ananda, que se tornou uma amiga, que esteve presente em todos os momentos dessa jornada e principalmente com a colaboração na Estatística.

Aos amigos que mesmo distantes, de alguma maneira se fizeram presentes nesses últimos anos.

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim
a caminhada. Caminhando e semeando,
no fim terás o que colher”.*
Cora Coralina

RESUMO

Em ambientes salinos, destacam-se as bactérias do gênero *Vibrio*, presentes na água, no sedimento ou em organismos como moluscos, camarões, e peixes. Dentre espécies de víbrios, 13 são patogênicas, como o *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e o *Vibrio harveyi*, esse particularmente problemático para animais aquáticos cultivados, podendo gerar impacto à carcinicultura no sul do Brasil. Apesar da importância deste grupo de bactérias, não há trabalhos sobre vibriáceos relacionando aquicultura, qualidade do pescado e saúde pública no litoral paranaense. O monitoramento de víbrios na água é importante na avaliação de locais apropriados para a instalação e/ou manejo de cultivos aquícolas. Também funciona como vigilância sanitária do pescado a fim de se oferecer produtos microbiologicamente seguros ao consumidor. Pontal do Sul (Pontal do Paraná, PR) é um balneário frequentado por turistas, abriga atividades portuárias, atividade pesqueira ao longo do ano, além de ter, em anos recentes, iniciado alguns projetos aquícolas em seu entorno. Este trabalho registrou a presença de *Vibrio* spp. em águas de Pontal do Sul, de janeiro a março de 2013. Os pontos de amostragem foram uma praia exposta (P1), estuário (P2), praia protegida (P3), praia semi-exposta (P4) e um manguezal (P5). Das amostras de água, coletadas quinzenalmente, foram inoculados 0,1mL, em duplicata, no ágar tiosulfato citrato bile sacarose, TCBS, incubadas a $33 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24h. Após a identificação fenotípica dos isolados, fez-se de contagem e categorização das colônias conforme utilização da sacarose do meio, coloração amarela (SAC⁺) ou verde (SAC⁻). Os isolados transferidos para o ágar soja tripticase, TSA, foram submetidos às provas de Gram, oxidase, catalase, motilidade, sulfeto, indol e lisina. Não houve diferença significativa ($p < 0,5$) entre as variáveis físico-químicas da água amostrada; o pH se manteve próximo de 7,5 e a temperatura em torno de 24°C . Para a salinidade, as maiores médias ocorreram em P1 (32,4) e em P4 (33,2). Também não houve diferença significativa para o número total de colônias isoladas, nem para o número de colônias SAC⁻, entre os 5 pontos de amostragem, ao longo do estudo. Em contraste, houve diferença significativa para o número de colônias SAC⁺, em que P2 originou a maior média (50,9 UFC), seguido de P3 (19,3 UFC) e P5 (15,8 UFC), as quais não diferiram significativamente entre si. Valores médios de SAC⁺ para P1 e P4 também não foram significativamente diferentes entre si (11,6 UFC e 7,9 UFC, respectivamente). Do total de colônias suspeitas isoladas e submetidas às provas complementares, 82 isolados foram confirmados como *Vibrio* spp.. Este estudo demonstra que as águas do balneário Pontal do Sul possuem *Vibrio* spp., com destaque para os víbrios sacarose positiva, onde podem estar incluídos *Vibrio cholerae*, *V. alginoliticus* e *V. harveyi*, espécies de grande importância à saúde pública e à aquicultura. O ponto P2, onde se registrou o maior número de bactérias SAC⁺, é o local de maior trânsito de pessoas, embarcações e residências. Trabalhos complementares sobre a identificação de espécies e dinâmica dos víbrios nas quatro estações do ano estão em andamento.

Palavras-chave: *Vibrio* spp, Vibriose, Sanidade aquícola, Bacteriologia, Aquicultura.

ABSTRACT

Vibrio bacteria are usually found in marine and brackish environment, in the water, the sediment, in mollusks, shrimps and fish, among others. From the *Vibrionaceae* family, at least 13 strains are pathogenic such as *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Vibrio harveyi* is a major obstacle for marine culture, thus representing a threat to the shrimp farms in the south of Brazil. Although *Vibrio* is recognized as an important group of bacteria, there are not studies correlating *Vibrionaceae* with aquaculture, seafood quality and public health in the Paraná coast. Besides being a touristic place, Pontal do Sul (Pontal do Paraná, PR) holds busy port activities, fisheries, as well as some new aquaculture projects growing nearby. Therefore, monitoring the presence of *Vibrios* spp. in the water bodies may help indicate appropriate areas for the installation and management of our marine farms. It can also work as part of a microbiologic surveillance of the seafood commercialized there. The current study investigated the presence of *Vibrio* spp. in waters of Pontal do Sul, from January to march, 2013. Five points were sampled at every 15 days: Unsheltered beach (P1), estuary (P2), sheltered beach (P3), semi-sheltered beach (P4) and mangroove (P5). The water samplings (0,1mL) were inoculated, in duplicate, in thiosulfate citrate bile salts and sucrose medium (TCBS agar) and incubated at $33 \pm 3^{\circ}\text{C}$ for 24h. Following the phenotypic identification of the colonies, they were counted and sorted according to its use of sucrose, yellow colonies (SAC^+) or green colonies (SAC^-). The isolates transferred to triptone soy agar (TSA) were submitted to Gram, oxidase, catalase, sulfur reduction, indole production, motility and lysine decarboxylase. There was no significant difference ($p < 0.5$) between the physicochemicals parameters of water; The pH kept on 7.5 and the temperature around 24°C . For salinity, the highest averages occurred in P1 (32.4) and P4 (33.2). Likewise, among the 5 points sampled during the study, no significant difference was found for the total of colonies grown in TCBS, nor for the total of colonies SAC^- . In contrast, a significant difference was found for the colonies SAC^+ , in which P2 had the highest average (50.9 UFC), followed by P3 (19.3 UFC) and P5 (15.8 UFC). Among them, however, there was no difference. Similarly, for SAC^+ there was no difference between P1 and P4 (11.6 UFC and 7.9 UFC, respectively). From the total number of colonies isolated in TCBS and submitted to the bacterial tests, 82 isolates were confirmed as *Vibrio* spp.. This study demonstrates that the waters of Pontal do Sul host *Vibrio* spp., especially those sucrose positive (SAC^+), in which can be included *Vibrio cholerae*, *V. alginoliticus* and *V. harveyi*, all considered highly relevant to both the aquaculture and the public health. The point where most of bacteria SAC^+ were found (P2) is the local where there the highest traffic of people and boats. Additional research on the identification of *Vibrios* species, as well as their dynamic along the four seasons is in course.

Palavras-chave: *Vibrio* spp, Vibriosis, Aquaculture health, Bacteriology, Aquaculture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O GÊNERO <i>VIBRIO</i> E SUAS IMPLICAÇÕES	1
1.1.1 Vibriose e saúde pública	1
1.1.2 Vibriose e saúde aquícola	3
1.2 LEGISLAÇÃO	4
2. JUSTIFICATIVA	6
3. OBJETIVO GERAL	7
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
4. ÁREA DE ESTUDO	8
5. MATERIAL E MÉTODOS	10
5.1 AMOSTRAGENS	10
5.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	12
5.2.1 Testes Presuntivos	14
5.2.1.1 TCBS	14
5.3.1.2 Coloração de Gram	15
5.3.1.3 Oxidase	15
5.3.1.4 Catalase	15
5.2.2 Provas bioquímicas complementares	16
5.2.2.1 Lisina, Motilidade e Indol (Meio LMI)	16
5.2.2.2 Sulfeto, Indol e Motilidade (Meio SIM)	16
5.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS	17
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
8. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

O ambiente aquático é um importante habitat de microrganismos, dos quais alguns são patogênicos para animais e humanos como, por exemplo, bactérias da família *Vibrionaceae*. Desta família, destaca-se o gênero *Vibrio*, de ocorrência mundial, sobretudo em água salgada, e capaz de afetar negativamente a saúde do homem, bem como gerar problemas para o cultivo de organismos aquáticos (SILVA, 2003). Os víbrios possuem morfologia predominante de bacilos retos ou formato de vírgula, são móveis, anaeróbicos facultativos, Gram negativos, não produzem sulfeto de hidrogênio e apresentam positividade nas provas de Oxidase e lisina-decarboxilase (LIMA, 2007). Apesar de ocorrerem naturalmente no ambiente aquático, há várias espécies patogênicas de *Vibrio* cuja multiplicação e virulência são influenciadas pela condição do hospedeiro e por fatores ambientais como temperatura e salinidade (CERICATO, 2012). Os víbrios desenvolvem-se bem em ambientes contendo 2 a 3% de NaCl e na faixa de 20 a 30°C, com crescimento diretamente proporcional à temperatura (COSTA, 2006). No entanto, em temperaturas mais baixas, eles podem permanecer nos sedimentos do fundo do mar ou de viveiros, em pequenas concentrações sem, contudo, ocasionar infecções (RAMOS, 2012).

1.1. O GÊNERO *VIBRIO* E SUAS IMPLICAÇÕES

1.1.1. Vibriose e saúde pública

O gênero *Vibrio* é de grande importância tanto para a aquicultura, diretamente, quanto para a saúde pública (RODRIGUES *et al.*, 2001); o perigo potencial para a saúde humana está vinculado à ingestão de água ou alimento de origem aquática (frutos do mar). Das mais de 70 espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, pelo menos 12 são patogênicas ao homem e/ou têm sido associadas a doenças transmitidas por alimentos (HUSS *et al.*, 2004). Estas bactérias podem

causar gastroenterites, diarreias, septicemias, otites e infecções de pele devido ao consumo de alimentos contaminados e também por contaminação em feridas cutâneas, ocorrida durante contato com água do mar ou estuarina (COSTA, 2006). O *Vibrio cholerae*, agente causador da cólera, doença relativamente comum, mas altamente impactante, causa transtornos gastrointestinais severos, podendo levar o indivíduo à morte em poucos dias. *V. cholerae* é de origem humana, atinge as águas do mar, rios e lagos através do despejo de esgotos e é de suma importância, pois é responsável por verdadeiras pandemias e mortalidade elevada (YASHIRO, 2007). *V. cholerae* sorotipos O1 e O139 são dos mais preocupantes, sendo associados a graves surtos de diarreias em várias partes do mundo (RAMOS, 2012); No município de Paranaguá, PR, em 1999, houve centenas de casos confirmados de cólera; Uma das hipóteses sobre a origem do patógeno é a água de lastro dos navios (HASEGAWA *et al.*, 2013). A doença cólera, embora possa ser contraída através de água e alimentos diversos, tem estreita relação com a ingestão de bivalves contaminados (COSTA *et al.*, 2009).

Por sua vez, o *V. parahaemolyticus*, habitante comum do mar, principalmente nas regiões costeiras, é adquirido através da ingestão de pescados crus ou malcozidos, ocasionando gastroenterites severas (PEREIRA *et al.* 2007). A espécie *V. vulnificus* também pode ser contraído pela ingestão de frutos do mar contaminados, mas é particularmente perigosa quando há feridas abertas expostas à água salgada. Entre pessoas saudáveis, a ingestão de *V. vulnificus* pode causar vômitos, diarreias e dor abdominal. Em pessoas com a imunidade enfraquecida, principalmente aquelas com doença renal crônica, *V. vulnificus* provoca infecção severa, com risco de morte, caracterizada por febre e calafrios, queda de pressão arterial (choque séptico) e rompimento de lesões na pele. A incidência de infecção sistêmica por *V. vulnificus* é de aproximadamente 50%.

A presença de espécies de *Vibrio* de importância sanitária em alimentos de origem marinha destinados ao consumo humano vem sendo relatada no Brasil. Pereira *et al.* (2004) relacionaram surtos de gastroenterites com a detecção de *V. parahaemolyticus* em amostras de moluscos bivalves marinhos comercializados no Rio de Janeiro (RJ) e identificaram cepas produtoras de urease e sorotipos reconhecidos como patogênicos. Sousa *et al.* (2004) relataram a presença de *V.*

cholerae não O1/ não O139 em 33,3% das 300 amostras de ostras oriundas de ambiente natural, na cidade de Fortaleza, CE (Costa *et al*, 2009).

1.1.2. Vibriose e sanidade aquícola

Os vibrios representam grandes perdas econômicas para a indústria aquícola, especialmente na produção de crustáceos (BESERRA DA SILVA *et al*, 2012). Vibrios fazem parte da microbiota natural dos camarões, sendo por isto, rotulados como oportunistas; entretanto, por serem capazes de desencadear enfermidade em qualquer estágio de desenvolvimento da criação, as espécies de *Vibrio* associadas a infecções de camarões estão entre os microrganismos mais impactantes à carcinicultura. Os vibrios podem provocar mortalidade de até 100% nas primeiras 24 horas do aparecimento da infecção, portanto, o potencial para causar prejuízos econômicos aos cultivos de crustáceos é considerável (COSTA, 2006; CERICATO, 2012). Os vibrios desencadeiam a infecção preferencialmente onde existam fatores estressantes, ou seja, a vibriose é favorecida pelas altas densidades populacionais ou problemas de qualidade de água. Variações ambientais, portanto, influenciam tanto a susceptibilidade do hospedeiro quanto a ação dos vibrios na evolução da patogenia.

Sinais clínicos de vibriose em camarões vão desde lesões ou necrose dos tecidos até o crescimento retardado dos animais, o que compromete suas fases de metamorfose. Pode haver, ainda, infecção entérica e sistêmica. O impacto da vibriose é variável, mas na fase crônica os camarões mortos ou moribundos podem sofrer canibalismo e contaminar rapidamente outros indivíduos da população (LIMA, 2007). No caso dos peixes acometidos, os sintomas clínicos são similares aos dos crustáceos, ou seja, perda de apetite, necrose de pele, natação errática e alterações no trato intestinal, brânquias, coração, fígado e rins (SILVA, 2003; PEGGY e FRANCIS-FLOYD, 2009). Salienta-se que, tanto em humanos quanto em animais, estes sinais clínicos podem ser confundidos com diversas outras patologias, portanto, o isolamento da bactéria (somado ao histórico do paciente) é fundamental ao diagnóstico preciso e confiável.

Diversas espécies aquícolas são susceptíveis à vibriose, principalmente em sistemas de produção intensiva, por isso é sempre importante o conhecimento do estado de saúde dos animais e do entorno na área de cultivo. Para os bivalves, devido ao seu processo de alimentação peculiar – filtração de água circundante, retenção e acumulação do que estiver presente no seu ambiente, é fácil abrigarem bactérias patogênicas nos seus tecidos. Na prática, a vibriose não representa ameaça direta aos bivalves. O perigo está na ingestão de bivalves, *in natura*, que abriguem víbrios; Além de não ser possível identificar bactérias a olho nu, os moluscos contaminados por vibrios não apresentam modificações na aparência, sabor ou odor da carne (RAMOS, 2012). Se contaminados e ingeridos crus a infecção do consumidor é iminente, assim, basta que o ambiente esteja contaminado para que a chance de o molusco abrigar o *Vibrio* seja motivo de alerta (VIEIRA *et al*, 2010).

O monitoramento da quantidade e de tipos de víbrios na água é deste modo, importante na avaliação de locais apropriados para a instalação e/ou manejo de cultivos aquícolas. Também funciona como vigilância sanitária do pescado a fim de se oferecer produtos microbiologicamente seguros ao consumidor. A identificação prévia de microrganismos é sempre uma arma na prevenção e na lida com patologia de organismos aquáticos. Pontal do Sul é um local que reúne características propícias ao estudo dos víbrios já que é um balneário altamente frequentado por turistas, abriga atividades portuárias, além de possuir atividade pesqueira ao longo do ano e ter iniciado alguns ensaios de atividade aquícola em seu entorno.

1.2 Legislação

No Brasil, a qualidade bacteriológica de pratos prontos para o consumo à base de pescados é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que preconiza, por exemplo, uma tolerância bacteriana por grama de sushi ou de outro produto à base de pescado de até 100 coliformes termotolerantes, 5000 *Staphylococcus* coagulase positivo, 1000 *Vibrio parahaemolyticus* e ausência

de *Salmonella* em 25g de produto. Alimentos de origem marinha têm sido apontados como fontes potenciais de contaminação por membros do gênero *Vibrio*, do qual espécies patogênicas presentes em pescados crus representam um risco para saúde dos consumidores. Na última década houve surtos de vibrios causadores de enfermidades que merecem destaque e, apesar da menor severidade dos casos quando comparados ao vibrião colérico, eles podem ser devastadores, a exemplo do *V. parahaemolyticus*. (COSTA *et. al*, 2007). Recentemente o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) publicou uma Instrução Normativa (IN nº7 de 08/05/12) sobre o Programa Nacional de Controle Higiênico-sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB). Com responsabilidades divididas, o MPA é o responsável pelo monitoramento de microrganismos e de biotoxinas marinhas, enquanto o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) fiscaliza e inspeciona as indústrias processadoras de moluscos bivalves que tenham certificação do MPA. Até o momento, os únicos microrganismos contemplados no PNCMB e com referências para monitoramento e controle são bactérias coliformes.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de o gênero *Vibrio* ser de grande importância para a aquicultura e para a saúde pública não há, até o momento, na literatura técnico-científica, estudos sobre tais bactérias no litoral Paranaense. Há, no entanto, junto ao Setor de Saúde, registros de 467 casos de cólera confirmados no município de Paranaguá no ano de 1999 (HASEGAWA *et al.*, 2013). O litoral paranaense e o balneário Pontal do Sul, em especial, além de receber grande número de visitantes que aproveitam as praias e ilhas, possui atividades portuárias próximas e também abriga uma população de pescadores que comercializam seu pescado sem garantia sanitária em relação aos *Vibrios*. E, recentemente, de interesse especial para a aquicultura, algumas comunidades próximas a Pontal do Sul começaram a instalar sistemas de produção e a explorar o cultivo de moluscos bivalves. O próprio Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) vem fomentando a implantação de um Programa de monitoramento de bivalves, cuja estruturação primária está a cargo da Região Sul do Brasil, dada à importância da malacocultura regional.

Assim, este trabalho de TCC é, provavelmente, inédito e aplicável às demandas aquícolas, pois vai dar início ao levantamento e caracterização de *Vibrios* no litoral paranaense, como forma de balizar trabalhos adicionais que levantem informações úteis à aquicultura local e também às autoridades sanitárias. Para a quantificação de *Vibrio* spp., várias técnicas microbiológicas de laboratório e de campo precisaram ser conduzidas, de modo a colocar em prática o conteúdo de disciplinas do curso de Tecnologia em Aquicultura.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de *Vibrio* spp. em corpos hídricos do balneário Pontal do Sul, Paraná.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias do gênero *Vibrio* na água de 05 locais distintos do balneário Pontal do Sul, na estação do verão
- Validar metodologia simplificada para o isolamento, contagem e identificação presuntiva de bactérias do gênero *Vibrio* em água, identificando gargalos no processo de obtenção, identificação e conservação dos isolados;
- Classificar e quantificar colônias de víbrios conforme sua utilização de sacarose do meio de cultura
- Registrar e comparar a incidência dos tipos de víbrios, quanto sua utilização de sacarose do meio de cultura, nos diversos pontos de amostragem de água em Pontal do Sul.

4. ÁREA DE ESTUDO

O local escolhido para o estudo foi o balneário Pontal do Sul (Figura 1), por duas razões principais: 1) Pela importância de Pontal do Sul em termos de diversidade de atividades, ou seja, a pesca e a comercialização do pescado, o turismo frequente, atividades portuárias e a aquicultura emergente; 2) Facilidade de logística e de execução do trabalho dentro do prazo disponível, sobretudo pela localização do Centro de Estudos do Mar (CEM) e dos laboratórios envolvidos nas análises.

A)

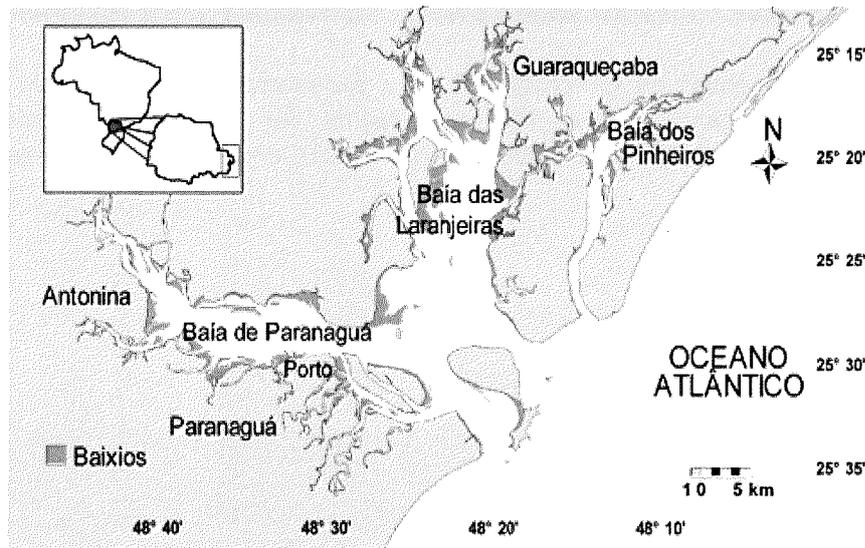


Figura 1 – O Complexo Estuarino de Paranaguá – PR.

B)

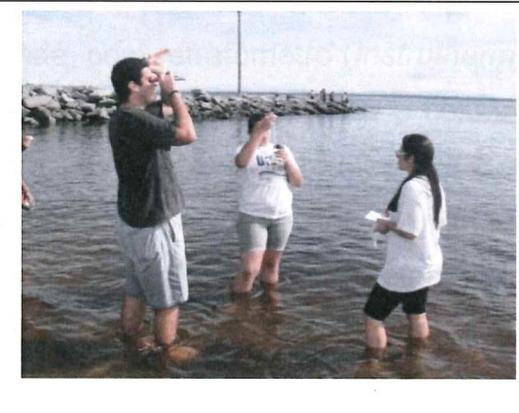
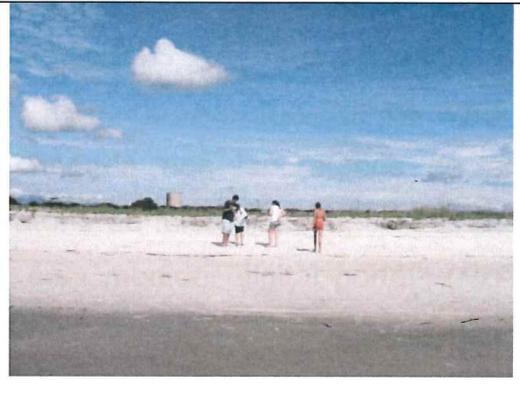


Figura 1: A: Mapa do litoral paranaense e B: Detalhamento do Balneário Ponta do Sul, com indicação (setas) dos pontos de amostragem, P1 a P5 (imagens: www.google.com e http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0102-261x2007000500010&script=sci_arttext).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. AMOSTRAGENS DE ÁGUA

O total de 05 amostragens de água foi realizado quinzenalmente, em cada um dos 05 pontos denominados P1, P2, P3, P4 e P5, no balneário Pontal do Sul, Pontal do Paraná-PR, na estação do verão (de 22/01 a 19/03/2013). Cada ponto está ilustrado e georreferenciado na figura 2.

	
<p>P1 – Praia exposta -25° 35' 6.80", -48° 21' 24.48"</p>	<p>P2 - Canal do DNOS (estuário) -25° 33' 57.05", -48° 21' 19.30"</p>
	
<p>P3 - Praia protegida Canto das Pedras -25° 33' 50.32", -48° 21' 14.40"</p>	<p>P4 – Praia do CEM -25° 34' 24.71", -48° 20' 51.58"</p>



P5- Mangue da Gamboa do Perequê -25° 34' 23.25", -48° 21' 3.64"

Figura 2. Pontos de amostragem de água (P1 a P5) para pesquisa de *Vibrio* spp., com suas respectivas localizações no balneário Pontal do Sul, PR.

As amostragens foram padronizadas quanto ao horário de início e fim, material usado e ordem dos procedimentos. Foram feitas, *in loco*, anotações gerais sobre o clima do dia, a movimentação ou presença de pessoas próximas aos pontos de amostragens, presença de elementos ou fatos pertinentes e relevantes ao trabalho.

A água foi coletada num volume de 400 mL, em recipientes de vidro previamente esterilizados, a uma profundidade de 20 cm. Mediu-se, *in loco*, a salinidade, com refratômetro (*Instrutherm*, modelo RTS 101 ATC) e a temperatura da água com termômetro de vidro e coluna de mercúrio. As amostras de água foram mantidas em caixas isotérmicas até a chegada aos laboratórios de análises (Laboratório de Sanidade Aquícola e Laboratório de Microbiologia, ambos do CEM-UFPR) onde o pH era logo determinado, com medidor digital portátil (*PHTeck* – pH100).

5.2. PROCEDIMENTO LABORATORIAL

Dentro das primeiras horas ao fim das amostragens, o processamento das amostras foi conduzido no Laboratório de Microbiologia, em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com luz ultravioleta por 20-30 minutos. Após homogeneizar

as amostras, uma alíquota de 0,1 mL de água foi transferida e semeada pela técnica de "spread plate", em placas de Petri contendo meio Ágar Tiosulfato Citrato Sais de Bile, TCBS (*Difco, Becton-Dickinson, França*), recém-preparadas. Cada amostra de água foi semeada em duplicatas, e estas incubadas em estufa bacteriológica (*Quimis – modelo Q316M2*) a $33\pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, para posterior leitura, classificação e contagem das colônias. As colônias foram classificadas conforme utilização de sacarose do meio TCBS, ou seja, colônias amarelas, devido à fermentação do açúcar, foram denominadas sacarose positiva (SAC $^{+}$) e colônias esverdeadas, não fermentadoras do açúcar, sacarose negativa (SAC $^{-}$).

Após a contagem do número total de colônias e triagem de sacarose, transferiram-se 05 colônias do meio TCBS, selecionadas segundo características fenotípicas (tais como tamanho, aspecto e coloração) para o meio Agar Soja Trypticase, TSA (*Himedia Labs, Índia*) enriquecido com 3% NaCl. Estas foram incubadas a $33\pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para realização dos testes presuntivos, provas bioquímicas e para estocagem dos isolados (Figura 3).

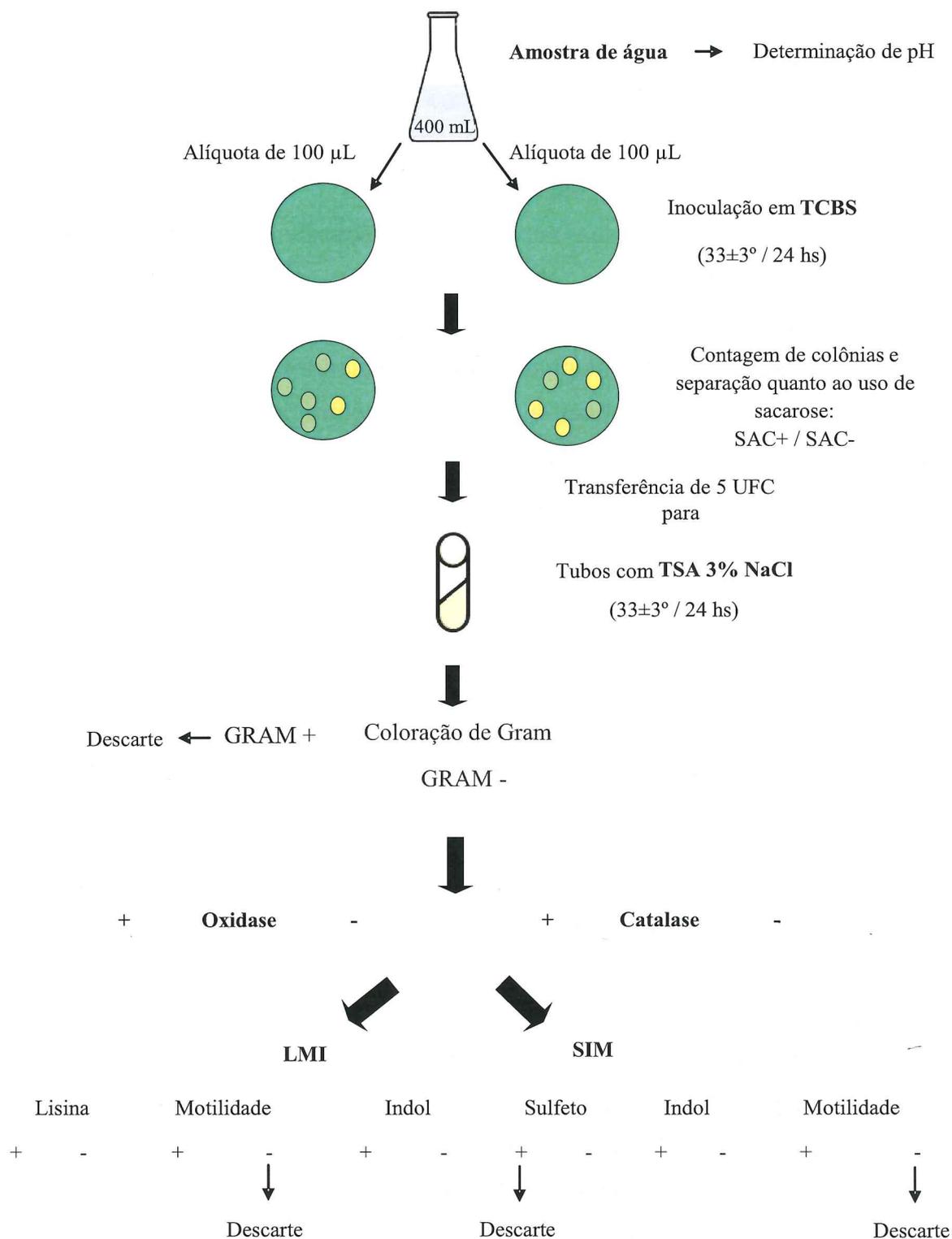


Figura 3: Fluxograma simplificado da análise da água para quantificação de bactérias do gênero *Vibrio* spp..

Os meios de cultura foram preparados no Laboratório de Sanidade Aquícola, em placas descartáveis e estéreis, na semana da sua utilização, a partir de formulações comerciais conhecidas. Os padrões de referência usados neste estudo foram as bactérias pertencentes ao banco *American Type Culture Collection-ATCC*, cepas *Vibrio cholerae* (ATCC 19522), *Vibrio mimicus* (ATCC 35653) e *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) para validação dos meios de cultura e demais provas usadas na identificação dos isolados suspeitos. Os testes bioquímicos usados foram Oxidase, Catalase, Sulfeto, Motilidade e Indol (SIM), e descarboxilação do aminoácido Lisina (LMI) conforme descrito mais adiante. Os meios LMI (*Laborclin*, Pinhais-PR), foram adquiridos em tubos prontos para a inoculação, mantidos sob refrigeração a 8°C e usados conforme recomendações do fabricante. Os tubos inoculados com as colônias suspeitas foram incubados por 24 horas a 33±3°C para leitura e interpretação imediata.

5.2.1 Testes Presuntivos

5.2.1.1 TCBS

O ágar TCBS é um meio altamente seletivo e diferenciado, onde, o extrato de levedura e a peptona fornecem nitrogênio e vitaminas. O citrato de sódio, tiosulfato de sódio, bÍlis de bovino e colato são agentes seletivos que fornecem um pH alcalino para inibir organismos Gram-positivos e suprimir os coliformes. O pH do meio é aumentado para potenciar o desenvolvimento de *Vibrio cholerae* uma vez que este organismo é sensÍvel a ambientes ácidos. A concentração elevada de sódio favorece o desenvolvimento de *Vibrio cholerae*, que é halotolerante e de outras espécies de *Vibrio* que, na sua maioria, são halófilas. As colônias crescidas em TCBS são classificadas em positivas ou negativas conforme utilização de sacarose do meio, ou seja, colônias amarelas, devido à fermentação do açúcar, são denominadas sacarose positiva (SAC ⁺) enquanto as colônias esverdeadas, não fermentadoras do açúcar, são sacarose negativa (SAC ⁻).

5.2.1.2 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi feita usando químicos do *Laborclin*, Pinhais-PR, em bactérias puras e recém-crescidas (24h) em meio TSA com 3% de NaCl. A leitura das lâminas foi feita com objetiva de imersão, em microscópio óptico (*Carl Zeiss Primostar*, Germany). Os isolados suspeitos foram selecionados de acordo com o resultado da morfologia (bastonetes) e cor das colônias. Portanto, colônias avermelhadas são Gram negativas, enquanto colônias roxo azuladas são Gram positivas.

5.2.1.3 Oxidase

A enzima citocromo oxidase é um complemento proteico transmembranar relacionada à cadeia respiratória de alguns microrganismos. As enterobactérias são oxidase negativa e podem ser diferenciadas de outros bacilos Gram negativos. Para o teste de Oxidase foram utilizadas tiras de papel embebidas em reativo de indofenol, prontas para uso (*Newprov*, Pinhais-PR). Com o auxílio de uma alça plástica descartável, transferiu-se uma porção do cultivo bacteriano para a tira teste friccionando-a e observando o desenvolvimento de cor dentro de alguns segundos. A coloração azul/roxa indica resultado positivo, enquanto se permanecer a coloração da própria colônia, o resultado para oxidase é negativo.

5.2.1.4 Catalase

A prova de catalase se destina à verificação da presença da enzima catalase na célula bacteriana. Tal enzima decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com

formação de água e oxigênio molecular. Coloca-se uma porção do cultivo bacteriano sobre uma lâmina de vidro limpa, adiciona-se uma gota de H₂O₂ 10% (*ADV Farma*, SP). Após aproximadamente 40 segundos, a formação de bolhas na amostra é considerada como resultado positivo. A não formação de bolhas dentro de 1 minuto da mistura indica reação negativa.

5.2.2. Provas bioquímicas complementares

5.2.2.1 Meio LMI (Lisina, Motilidade e Indol)

O meio de cultura ágar LMI permite a execução simultânea de três provas bioquímicas que são a descarboxilação de lisina, motilidade e indol. As amostras de bactérias foram inoculadas através de uma picada com agulha metálica, no centro do tubo contendo o meio de cultura, seguido de incubação por 24 horas a 35°C. Os resultados considerados positivos para a prova de lisina apresentaram o desenvolvimento de coloração púrpura na base do meio, enquanto a coloração amarelada caracterizou reação negativa. Para a prova da motilidade o resultado positivo foi evidenciado pelo crescimento difuso a partir da linha da picada (o meio se torna turvo). Para a prova de indol, após adicionar 3-4 gotas do reativo Kovac na superfície do meio, há o surgimento de um anel com coloração vermelha, indicando que a bactéria possui triptofanase, portanto, reação positiva. Um anel que permanece da cor do reagente indica reação negativa de indol.

5.2.2.2 Meio SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade)

Do crescimento do TSA contendo 3% de NaCl, as bactérias foram inoculadas com agulha metálica no ágar SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade) preparado

com 2% de NaCl, com incubação a 35°C por 24 hs. Após o período de incubação foi realizada a leitura dos tubos. Para o teste de sulfeto, foram considerados positivos os isolados que desenvolveram coloração negra no meio de cultura. Os procedimentos para inoculação e interpretação para os testes de indol e de motilidade são idênticos aos do meio LMI.

5.3 ANÁLISES DOS RESULTADOS

Os resultados deste estudo foram tabulados tanto no programa ASSISTAT 7.6 Beta (UFPB Campina Grande, PB) quanto no programa *Excel* (Microsoft Windows 7). Dados foram submetidos à ANOVA, com comparação de médias pelo teste t e com nível de significância $p \geq 0,05$. Foi feita a distribuição de frequência dos isolados “suspeitos” (correspondentes ao total de microrganismos crescidos nas placas de TCBS), assim como os testes de correlação entre o número total de suspeitos e tipo de suspeitos quanto à utilização de sacarose do meio (SAC⁺ ou SAC⁻) e, ainda, a correlação das três categorias (isto é, o total de suspeitos, os SAC⁺ e os SAC⁻) com os parâmetros físico-químicos da água nos pontos de amostragem. Análises similares foram feitas com os isolados “finalistas” (aqueles que passaram por todos os testes complementares e foram confirmados como *Vibrio* spp.).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

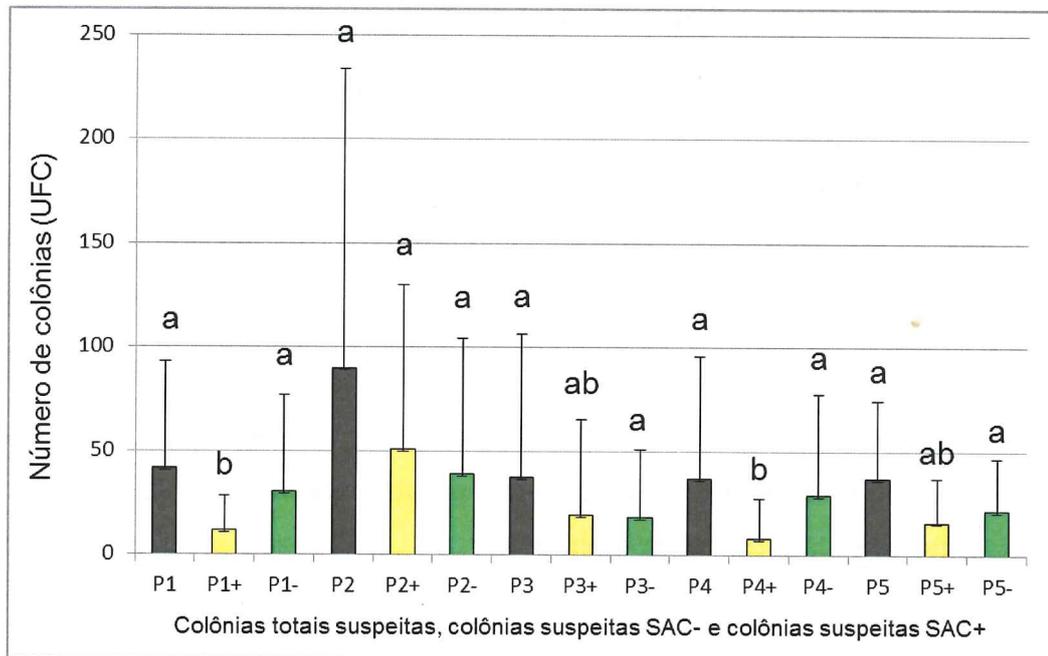


Figura 4: Quantidade média e desvio padrão de colônias suspeitas (P), de colônias suspeitas sacarose positiva (P+) e de colônias suspeitas sacarose negativa (P-) nos 5 pontos de amostragem ao longo do estudo.

A quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) crescidas no TCBS, denominadas “colônias suspeitas” é mostrada na figura 4. Observa-se que o total de isolados suspeitos variou, em números absolutos, entre os pontos de amostragem; neste caso, a maior média de suspeitos foi obtida em P2 (Canal, com 90,1 colônias) e em P1 (Praia exposta) ocorreu a segunda maior média de isolados (41,9 colônias). Embora o total de suspeitos de P2 represente, em valores absolutos, mais do que o dobro de suspeitos em P1, não houve diferença significativa a $p < 0,5$ (letras minúsculas iguais sobre as barras da figura 4) entre o número total de colônias suspeitas entre os 5 pontos de amostragem, ao longo do estudo. Na comparação da quantidade de colônias suspeitas SAC⁻, não houve diferença significativa entre os pontos P1 a P5. No entanto, os pontos de P1 (Praia exposta), P4 (Praia do CEM) e P5 (Gamboa Perequê) tiveram maior ocorrência de suspeitas SAC⁻ (verdes) em relação às suspeitas SAC⁺ (amarelas). Já no Canal (P2), houve 39,2 SAC⁻ contra 50,9 SAC⁺, enquanto em P3 (Canto das Pedras) houve 18,2 SAC⁻ contra 19,3 SAC⁺.

Quando se comparam as colônias quanto ao uso de sacarose (SAC⁺ e SAC⁻), o número de suspeitos SAC⁻ não apresenta diferença significativa entre os diversos pontos de amostragem, mas para o número de colônias suspeitas SAC⁺ a diferença é significativa. Assim, as amostras do Canal (P2) originaram a maior média de isolados SAC⁺ (50,9), seguidas do Canto das Pedras (19,3) e Gamboa do Perequê (15,8), as quais não foram significativamente diferentes entre si. Valores médios de SAC⁺ para amostras da Praia exposta (P1) e da Praia do CEM (P4) também não apresentaram diferença significativa entre si (11,6 e 7,9, respectivamente).

Tabela 1. Amplitude (entre parênteses), média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos da água amostrada para pesquisa de bactérias o gênero *Vibrio*, nos diversos pontos de amostragem, no Balneário Pontal do Sul, PR entre janeiro e março de 2013.

PARÂMETROS FÍSICO- QUÍMICOS	PONTOS DE AMOSTRAGEM (P1 – P5)				
	P1	P2	P3	P4	P5
pH	(7,4-8,0)	(6,9-8,0)	(7,4-8,0)	(7,2-8,1)	(7,1-7,5)
	7,74±0,24	7,38±0,50	7,7±0,24	7,7±0,35	7,26±0,18
TEMPERATURA	(23-27)	(21-26)	(22-27)	(22-28)	(22-27)
	24,6±1,81	23,9±2,13	24,8±2,16	25,3±2,48	24,4±2,40
SALINIDADE	(30-35)	(0-17)	(20-35)	(31-35)	(3-17)
	32,4±2,07	7,4±6,65	28,6±5,41	33,2±2,04	9,8±5,89

Na tabela 1 estão os dados ambientais. A salinidade foi o parâmetro físico-químico que apresentou maior amplitude ao longo das amostragens (35 a zero). No Canal (P2) se registrou a maior amplitude tanto de pH (6,9 – 8) quanto de salinidade (0 – 17). A maior amplitude de temperatura ocorreu no Canto das Pedras P3 (22 – 28°C). No entanto, a comparação de médias de pH e de temperatura, entre os pontos de amostragem, ao longo do estudo, não apresentou diferença significativa, ou seja, o pH se manteve próximo de 7,5 e a temperatura em torno de 24°C. Para a salinidade, as maiores médias ocorreram na Praia exposta (P1=32,4) e na Praia do CEM (P4=33,2).

Tabela 2. Correlação entre o número total de colônias suspeitas, entre o número de colônias suspeitas sacarose positivas (SAC⁺) e entre o número de colônias suspeitas sacarose negativas (SAC⁻) com os parâmetros físico-químicos da água amostradas em 5 pontos distintos dentro do Balneário Pontal do Sul, PR.

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)			
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA	TOTAL COLÔNIAS SUSPEITAS	COLÔNIAS SUSPEITAS SAC⁺	COLÔNIAS SUSPEITAS SAC⁻
pH	- 0,0631ns	- 0,1596ns	0,0482 ns
Salinidade	0,0089 ns	- 0,0507ns	0,1194 ns
Temperatura	- 0,0490 ns	- 0,1022ns	0,0489 ns

Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,5$) (ns=não significativo).

No decorrer do estudo, houve maior frequência de dias ensolarados e secos em relação a dias chuvosos, exceto na véspera da terceira amostragem, em que ocorreu uma chuva intensa e duradoura sem, contudo, haver queda da temperatura ambiente. Ao longo de todo o estudo, durante o período de coleta de água, foram feitas observações das áreas de amostragem quanto à presença de indivíduos, embarcações e outros eventos. Assim, a presença de pessoas no P3 (Praia

protegida Canto das Pedras) foi sempre constatada; são pescadores, banhistas, frequentadores do comércio local, apreciadores da natureza, das obras de ampliação portuária ou curiosos com interesses diversos. No Canal DNOS (P2) observa-se maior concentração e movimentação de pessoas e de embarcações em horários mais pontuais, porém a frequência de indivíduos diversos no local é menor do que na Praia protegida Canto das Pedras. Comparativamente, os pontos com menor trânsito de pessoas foram a Praia exposta (P1) e a Praia do CEM (P4).

Alteração de pH, de salinidade ou de temperatura, assim como o excesso de matéria orgânica associada à queda de oxigênio dissolvido, são condições favoráveis à manifestação de vibriose em ambientes naturais e ainda mais em locais de cultivos (MENDES *et. al*, 2009). Considerando os pontos de maior concentração de pessoas (P2 e P3) e a quantidade total de colônias suspeitas isoladas, vê-se uma relação positiva no Canal, de onde vieram mais de 90,0 isolados suspeitos. A probabilidade de haver quantidades consideráveis de enterobactérias na região do Canal é grande em função das marinas, residências e embarcações, cujos resíduos entram em contato com as águas dali. Neste tipo de ambiente, oportunamente, vários vibriões representam riscos diretos aos animais aquáticos e às pessoas que lidam ou que consomem pescado contaminado. A ocorrência de infecções por vibrios é mais frequente nos meses de verão, período em que sua distribuição quantitativa no ambiente marinho é maior (ARCHER & MORETTO, 1994). Dentre os locais amostrados, o Canal e a Gamboa do Perequê (P2 e P5) são, entre os 5 pontos, aqueles que sofrem maiores interferências das marés, tendo, comparativamente, as menores salinidades do estudo (7,4 e 9,8, respectivamente); dependendo da maior ou menor influência de água salgada, a prevalência da quantidade e do tipo de bactérias pode se alterar. O vibrião colérico, por exemplo, é halotolerante, portanto, se desenvolve melhor quanto mais baixa for a salinidade do ambiente. De fato, tanto na água do Canal quanto na Gamboa do Perequê, houve maior número de colônias SAC⁺, o que acena para a probabilidade de haver *Enterococcus faecalis*, *V. cholerae* e outros fermentadores de sacarose.

No meio TCBS, os vibriões fermentadores da sacarose (*V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii*) aparecem como colônias amarelas de média dimensão, lisas e opacas. A maioria dos outros vibriões com importância clínica, incluindo *V. parahaemolyticus*, não

fermenta a sacarose e aparece como colônias verdes. Todas estas características fenotípicas foram observadas nas colônias isoladas neste estudo. Embora o TCBS seja um meio largamente utilizado para cultivo de vibriónáceos, alguns autores afirmam que este não é um meio diferencial para o *V. harveyi* já que a sua utilização da sacarose é variável, o que pode confundir com outras espécies SAC⁺ ou SAC⁻ (HARRIS *et al*, 1996). No TCBS é, também, importante fazer a interpretação das colônias logo que são retiradas da estufa, pois, suas colorações originais podem se modificar e, assim, impedir a leitura correta. Todos os isolados deste estudo foram imediatamente contados e registrados após retirada da estufa.

Outros entraves relacionados ao meio TCBS são que *V. parahaemolyticus* pode se assemelhar às espécies *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* e *Pseudomonas*. As espécies *Proteus*, fermentadoras da sacarose, produzem colônias amarelas que podem se assemelhar às produzidas por espécies de *Vibrio*. Este fato ocorreu com duas colônias previamente triadas como *Vibrios*, mas que foram descartadas por utilizarem o sulfeto do meio SIM, produzindo coloração negra no meio, reação compatível com *Proteus*.

Algumas estirpes de *V. cholerae* têm uma aparência verde ou incolor TCBS devido à fermentação retardada da sacarose. Para evitar confusão desse tipo, as colônias eram deixadas na estufa e checadas, mesmo após as 24h requeridas para leitura, interpretação e condução de testes.

Testes bioquímicos e/ou sorológicos são necessários para uma identificação definitiva e para uma diferenciação entre espécies de *Vibrio* fermentadoras e não fermentadoras da sacarose. Assim, as primeiras triagens dos isolados suspeitos com a coloração de Gram, permitiram identificar colônias Gram negativas e com morfologia de bastonetes curvos, típicos do gênero *Vibrio*. Foram corados 199 isolados, dos quais 153 foram considerados negativos e passaram aos testes adicionais (oxidase, catalase, SIM e LMI). Suspeitos Gram positivos, como *Micrococcus* spp. ou suspeitos Gram negativos com morfologia diferente de bastonetes, foram descartados. Das quase 2400 colônias suspeitas crescidas nas placas de ágar TCBS, 84 chegaram ao final do estudo, isto é, passaram por todos os testes complementares e foram identificados como *Vibrio* spp. (Tabela 5). Apenas 02 dos 84 isolados "finalistas" apresentaram resultado positivo para sulfeto e foram

descartados. Isto indica que a leitura fenotípica no meio TCBS mais os testes complementares conduzidos neste estudo fizeram nossa triagem e classificação presuntivas foram consistentes e corretas, o que aprova a metodologia simplificada para a identificação de bactérias do gênero *Vibrio* proposta neste estudo.

Tabela 3. Total de isolados do gênero *Vibrio* spp. por pontos de amostragem referente à sequência das amostragens.

SEQUÊNCIA DAS AMOSTRAGENS (A)	NÚMERO DE COLÔNIAS DE <i>VIBRIO</i> spp. POR PONTOS DE AMOSTRAGENS				
	P1	P2	P3	P4	P5
A1	0	1	2	1	4
A2	0	5	3	5	0
A3	3	7	2	4	3
A4	5	4	3	1	2
A5	4	7	5	6	7
Total:	12	24	15	17	16

Total geral *Vibrio* spp.: 82

Total de *Vibrio* spp. SAC+: 35

Total de *Vibrio* spp. SAC -: 47

Estudos têm demonstrado a incidência de doenças causadas por vibrios isolados do meio aquático, de lesões cutâneas de pescadores (RODRIGUES *et al*, 2001) e, principalmente, a partir de frutos do mar (PEREIRA *et. al*, 2007). Várias cepas toxigênicas de *V. parahemolyticus* (O3:K6) têm sido isoladas de crustáceos e moluscos, mas principalmente de ostras (HAYAT *et al.*,2006). Além destes e do *V.*

cholerae, o *V. vulnificus* também é preocupante devido às severas gastroenterites e septicemia em humanos (PANICKER *et al.*, 2004). Estas mesmas espécies, junto com *V. alginolyticus* e *V. harveyi*, são especialmente impactantes para animais aquáticos, podendo ocasionar mortandades significativas em pisciculturas e em carciniculturas.

Nos EUA 95% de todas as mortes relacionadas ao consumo de pescado são atribuídas ao *Vibrio vulnificus*. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) relata que de 1996 a 2006 as infecções por vibrios aumentaram 78%. Já o ministério da agricultura americano (FDA) aponta que, cerca de 34 mortes/ano são por causa do *V. vulnificus*, e que só em 2005 foram 121 casos desta espécie. Rodrigues *et al* (2001) conduziram no município de Raposa - MA, um estudo para identificação de vibrios nas feridas cutâneas de 50 pescadores, com idade de 12 a 65 anos. O total de 21 indivíduos eram portadores de *Vibrio*, com predomínio da espécie *V. alginolyticus* (66,6%), seguido de *V. parahaemolyticus* (42,8%) e de *V. cholerae* não O1 (9,5%). As lesões predominaram nos membros inferiores, que apresentaram hiperemia, edema, secreção e dor.

No litoral do Paraná, os esforços para controle sanitário de moluscos bivalves vêm ocorrendo através de uma parceria entre a Associação dos ostreicultores de Guaratuba e a UFPR (*Projeto Cultimar*), entretanto, o monitoramento de ostras ora realizado tem seu foco na avaliação de bactérias coliformes. Já o monitoramento de vibrios não tem sido conduzido até então. Embora bivalves devam ser cultivados e coletados de águas livres de contaminação fecal, mesmo aqueles despescados ou extraídos legalmente podem estar contaminados por vibrões. Estas bactérias não alteram a aparência, sabor nem odor dos moluscos afetados. É importante que as pessoas reportem infecções por vibrios para melhorar a investigação sobre tais patógenos. Especialistas regionais com conhecimento em pescado podem assistir oficiais com o rastreamento de frutos do mar e, quando notificar os casos são capazes de rapidamente amostrar água suspeita para descobrir possíveis fontes de infecção, minimizar as consequências e, até, interditar criações com problemas identificados.

No Brasil, os padrões microbiológicos do pescado e de produtos derivados de pescados são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

na Resolução Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. No que concerne a vibrio, se estabelece (no item 22 desta norma) o limite de 10^3 de *Vibrio parahaemolyticus*/g em pratos prontos para o consumo à base de pescados. Costa *et al* (2007) analisaram amostras de salmão e de camarão comercializados em Sobral, Ceará, determinando NMP/g de *Vibrio* spp. de <3 a 230 (salmão) e de 240 a 1.100 (camarão). A carga de *Vibrio* das amostras de sushi de salmão não ultrapassou o limite estabelecido pela ANVISA, que é de 1.000 *V. parahaemolyticus*/g de produto, estando em condições satisfatórias para consumo. Para o camarão, 7 amostras (70%) apresentaram um NMP de 1.100 *Vibrio*/g que, não inviabiliza o produto para consumo, uma vez que se refere à carga de vibrio total e não de *V. parahaemolyticus*, conforme estabelece a legislação em vigor no país.

Ramos (2012) pesquisou vibrios marinhos potencialmente patogênicos em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas provenientes da Baía Sul de Santa Catarina, Brasil. Das 60 amostras de ostras, 48,3% estavam contaminadas por uma ou mais espécies de *Vibrio*. As espécies mais frequentes foram *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Das 60 amostras de água, 73,3% estavam contaminadas por uma ou mais espécies de vibrios; as contagens de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* nas amostras de água do mar variaram entre < 1,99 NMP /100 mL a 10 NMP/ 100 mL de água marinha, e < 1,99 NMP 100/ mL a 100 NMP 100/ mL de água marinha, respectivamente. De 106 cepas, 83 (78,3%) foram previamente identificadas como *V. parahaemolyticus*, 20 (18,9%) como *V. vulnificus*, três (2,8%) como *V. cholerae*.

Na região sudeste da Tailândia, *V. harveyi* é o mais importante patógeno do camarão tigre (*Penaeus monodon*) em fazendas de camarão, onde foi visto que quando esta bactéria "luminosa" excede 104 células/mL em viveiros adensados a doença causa danos severos aos camarões. Cepas altamente virulentas de *V. harveyi* resultam em 100% de mortalidade a partir de inóculos contendo menos que 100 células/mL (SAWITREE *et al*, 2006).

Uma vez que o controle de vibriões presentes na água salgada é difícil, algumas estratégias de prevenção da vibriose são adotadas. A carcinicultura tem se concentrado no uso de probióticos, não só na substituição de antibióticos antes empregados nos cultivos, mas para fortalecer os indivíduos produzidos através da modificação da comunidade microbiana do ambiente (BESERRA DA SILVA *et al*,

2012). No caso da malacocultura, a depuração dos bivalves antes da sua comercialização é um procedimento cada vez mais considerado. No laboratório de Bivalves da Universidade de Auburn (AUSL), fez-se a avaliação de um sistema de fluxo contínuo para eliminação de *Vibrio vulnificus* alterando 3 diferentes parâmetros, salinidade, temperatura e taxa de fluxo de água. A determinação do número de *V. vulnificus* nos tecidos das ostras foi conduzida em 0, 1, 2, 3 e 6 dias de depuração. Resultados mostraram que a quantidade do vibrio foi reduzida drasticamente no sexto dia em 7 dos 14 testes. Dois testes dentro dos 14 também foram significativamente diferentes do sistema de depuração controle, isto é ostras inoculadas em laboratório foram depuradas de >100.000 UFC/g de *V. vulnificus* nos tecidos para menos de 50 UFC/g em 6 dias. Alterações de temperatura e salinidade sozinhas ou combinadas tiveram pouca influência na redução do número de *V. vulnificus* nos tecidos das ostras. O aumento do fluxo de água de 11L/m para 68 L/m resultou em redução significativa de *V. vulnificus* nas ostras dentro de 6 dias de depuração, resultando em 3 UFC/g de uma concentração inicial de 110.000 UFC/g.

Ramos (2012) também testou formas de depuração de bivalves. O tratamento utilizando luz UV mais cloro foi mais eficiente para controlar *V. parahaemolyticus* em ostras. Tanto o tratamento utilizando luz UV, como o tratamento utilizando luz UV mais cloro foram eficientes para reduzir as contagens de *V. vulnificus*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alguns gargalos foram identificados neste estudo; além da dificuldade operacional, houve perdas de amostras decorrentes principalmente de contaminações por fungos e por larvas de insetos, o que impediu as repicagens das colônias para os testes dentro do cronograma estipulado. Foi preciso, também, ajustar a dinâmica do processamento das amostras nos laboratórios multiuso diante da impossibilidade de descartar "colônias-mãe" e/ou primeiros repiques, que demandaram vidaria e acomodação extras em tubos e recipientes. Além disto, o comportamento irregular das diversas colônias isoladas (quanto a tolerância de NaCl nos meios e melhor temperatura de incubação) exigiu repicagens sucessivas e alguns retestes.

8. CONCLUSÃO

O objetivo de se iniciar um levantamento das condições da água de locais passíveis de receberem cultivos aquícolas ou que de algum modo, possam influenciá-los foi alcançado com os dados obtidos. Isto foi possível especialmente porque a metodologia proposta no estudo foi suficiente para isolamento e categorização dos vibrios conforme a utilização de sacarose. As águas do balneário Pontal do Sul possuem *Vibrio* spp., com destaque para os vibrios sacarose positiva, onde podem estar incluídos *Vibrio cholerae*, *V. alginoliticus* e *V. harveyi*, espécies de grande importância à saúde pública e à aquicultura. Desse modo, trabalhos adicionais devem ser conduzidos para que se possa estabelecer um mapeamento da dinâmica, da identificação de espécies isoladas e da avaliação da possível patogenicidade destes isolados.

Espera-se que os resultados possam ser apenas o início de um esforço mais abrangente, para balizar futuras ações ligadas ao controle sanitário das criações de organismos aquáticos do litoral paranaense.

REFERÊNCIAS

ARCHER, M. R. B. & MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de banco natural do litoral do município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. Cad. Saúde Públ., Rio de Janeiro, 10 (3): 379-386, Jul/Set, 1994.

BESERRA DA SILVA, E. F., FROES, C. N., SOUZA, D. M., SOARES, R., PEIXOTO, S., WASIELESKY, W., BALLESTER, E. L. C.. Uso de Probióticos na produção de pós-larvas de camarão-rosa. Pesq. Agrop. Bras., Brasília, n.6, p.869-874, Jun 2012.

CERICATO, LEONARDO. Diagnóstico das Principais doenças bacterianas na Carcinicultura Marinha, Vibriose e NHP. Prevenção e Tratamentos. Disponível em http://www.psfaquicultura.ufc.br/site/wp-content/uploads/2012/05/Palestra-no-PSF_CAMAR%C3%83O. Leonardo Cericato - MSD.pdf. Acesso em 20 de fevereiro de 2013.

COSTA, R. A. Pesquisa de *Vibrio* no cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará. (Dissertação Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará – 2006.

COSTA, R. A., VIEIRA, F. H. G., SILVA, C.G., PEIXOTO, O. R. J., BRITO, V.M.. Bactérias de interesse sanitário em sushi comercializado no Ceará. Bol. Téc. Cient. CEPENE, Tamandaré, v. 15, n. 1, p. 15-19, 2007.

COSTA, R. A.; VIEIRA, F. H. G.; VIEIRA, R.H.S.F; SAMPAIO, S. S. *Vibrio* em amostras de água de viveiros de cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Ceará, Brasil. Atlântica, Rio Grande, v.31, n.2, p.177-182, 2009.

HAYAT MAHMUD, Z.; KASSU, A.; MOHAMMAD, A.; YAMATO, M.; BHUIYAN, N. A et al. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel Japan. *Microbiol.Res.*, v. 161, n. 1, p. 25-37, 2006.

HUSS, H.H.; ABABOUCHE L. ; GRAM, L. Assessment and management of seafood safety and quality. Fisheries technical paper N°44. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), Rome, 2004.

LIMA, ANAHY DE SOUZA. *Vibrio* em camarão e na água de três fazendas de carcinicultura do Ceará. (Dissertação Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará – 2007.

MATTHEW R. LEWIS, SCOTT RIKARD, COVA ARIAS. Evaluation of a flow-through depuration system to eliminate the human pathogen *Vibrio vulnificus* from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture 2010 - Meeting Abstract*. Disponível em www.was.org

MENDES, E. S; LIRA, S. F; GOES, L. M. N. B; DOURADO, J; MENDES, P. P.; ALVES, C. A. B. *Vibrio* spp. Isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 4, p. 1191-1199, out./dez. 2009.

PANICKER, G.; CALL, D. R.; KRUG, M. J. & BEJ, A. K. Detecção de patogênicos em moluscos por meio de PCR multiplex e DNA microarray. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 7436-7444, 2004.

PEGGY, A. REED; RUTH FRANCIS-FLOYD. *Vibrio* Infections of Fish (FA 31). Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida – IFAS Extension). Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu>, Acesso em 15 de jun de 2013.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D.P. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.27, n2, p. 387-390, abr-jun. 2007.

PEREIRA, C. S, AMORIM, S. D, SANTOS, A. F. M, SICILIANO, S., MORENO, I. M. B., OTT, P. H., RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. Isolados de mamíferos marinhos capturados na região litorânea do sudeste ao sul do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 27 (2): 81-83, 2007.

Protocolos de Microbiologia Clínica. NewsLab - edição 87/2008, página 61. Disponível em <http://dc387.4shared.com/doc/W-sgNxXW/preview.html> acesso em 20 de fevereiro de 2013.

RAMOS, Roberta Juliano. *Vibrio* spp. em ostras e águas de áreas de cultivo da Baía Sul de Santa Catarina: Ocorrência, caracterização fenotípica e genotípica, suscetibilidade antimicrobiana e depuração. (Dissertação Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina – 2012.

RODRIGUES, S. M. A.; GONÇALVES, E. G. R.; MELLO, D. M.; HOFER, E. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa - MA. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 34, n. 5, p. 407-411, 2001.

VIEIRA, R. H. S. F; ROCHA, R. S.; CARVALHO, E. M. R.; SOUSA, O. V.; GESTEIRA, T. C. V. *Vibrio* na água e sedimento de viveiros de quatro fazendas de carcinicultura no estado do Ceará, Brasil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. São Paulo, v. 47, n. 6, p. 454-460, 2010.

SAWITREE T.; PIMONSRI RATANAMA; KARNARCHANA WEERACHAPOL;; AMPAITIP SUKHOM *et al.* Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. *Aquaculture*, v 261, p.1-9, 2006.

SILVA, Marcus Adonai Castro. Ocorrência e caracterização de *Vibrio vulnificus* isolados de amostras de moluscos e águas de áreas de cultivo em Santa Catarina. (Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí – 2003.

YASHIRO, Daniela Sualdini. Qualidade do Pescado em Feira Livre. (Especialização *Latu sensu* de Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Vigilância Sanitária Animal) Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2007.