

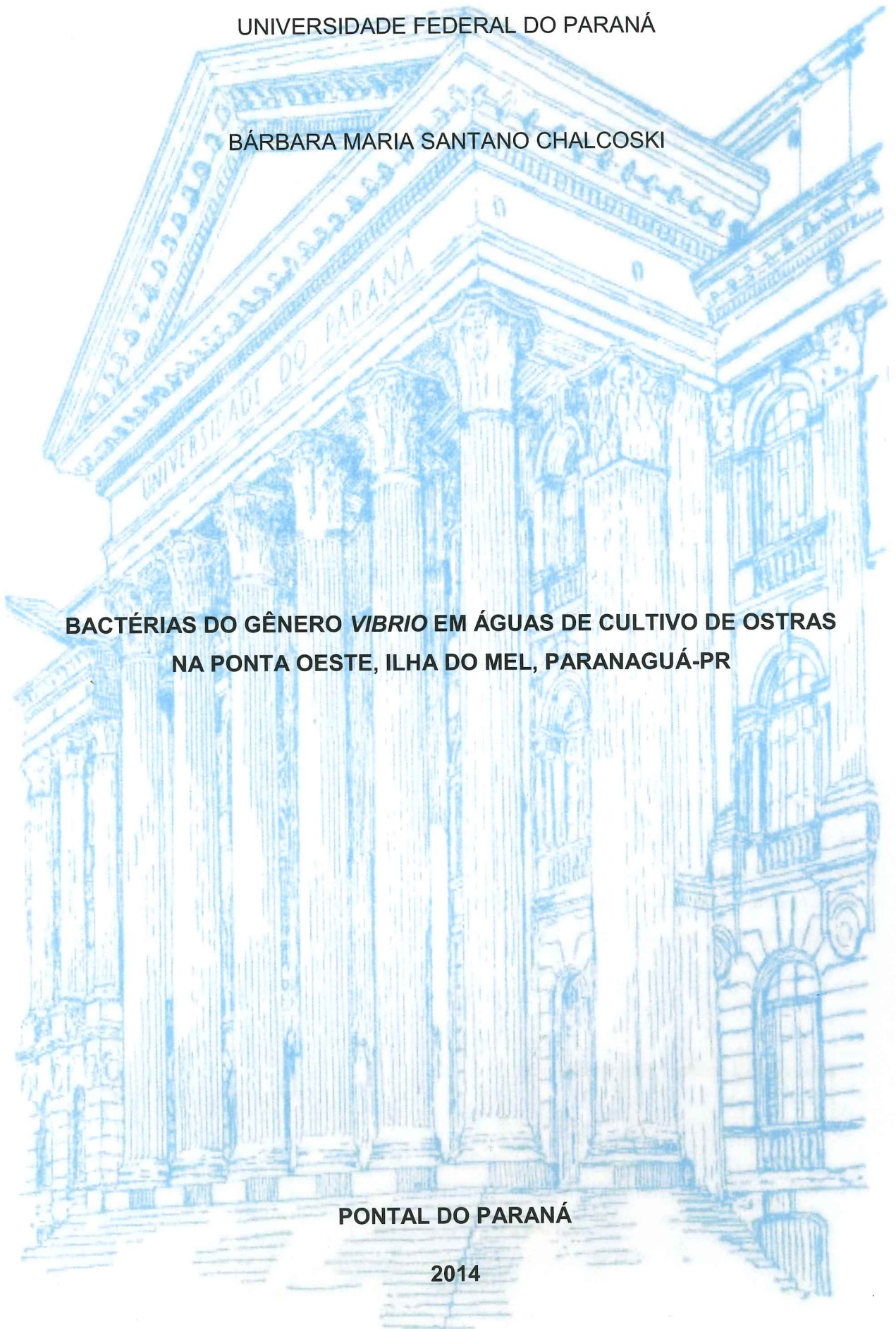
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BÁRBARA MARIA SANTANO CHALCOSKI

**BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO* EM ÁGUAS DE CULTIVO DE OSTRAS  
NA PONTA OESTE, ILHA DO MEL, PARANAGUÁ-PR**

PONTAL DO PARANÁ

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BÁRBARA MARIA SANTANO CHALCOSKI

**BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO* EM ÁGUAS DE CULTIVO DE OSTRAS  
NA PONTA OESTE, ILHA DO MEL, PARANAGUÁ-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: Dr Luciene Correa Lima

PONTAL DO PARANÁ

2014

M  
2014-05  
10-01

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

C436b Chalcoski, Bárbara Maria Santano  
Bactérias do gênero *Vibrio* em águas de cultivo de ostras na ponta oeste, Ilha do Mel, Paranaguá-PR. / Bárbara Maria Santano Chalcoski. – Pontal do Paraná, 2014.  
32 f.; 29 cm.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Luciene Correa Lima.

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

1. *Vibrio spp.* 2. Sanidade Aquícola. 3. Bacteriologia. 4. Aquicultura. I. Título.  
II. Lima, Luciene Correa. 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](mailto:aquicultura@ufpr.br)

### **TERMO DE APROVAÇÃO**

**Barbara Maria Santano Chalcoski**

#### **PESQUISA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO VIBRIO EM ÁGUA DE CULTIVO DE OSTRAS NA PONTA OESTE, ILHA DO MEL, PARANAGUÁ-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:

**Drª Luciene Correa Lima**  
Orientador e Presidente

**Drª Hedda Elisabeth Kolm**  
Membro Examinador

**Drª Gisele Castilho**  
Membro Examinador

Pontal do Paraná, 11/06/2014.



## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a vida e por me dar força e coragem para superar todos os obstáculos dessa caminhada.

A minha mãe e melhor amiga, Joseane e ao meu pai querido Noraldo que está no céu olhando por mim, que dedicaram a vida para me proporcionar a melhor educação, que sempre acreditaram em mim e me deram todo o apoio necessário para me tornar a pessoa que sou hoje.

A minha irmã Gabrielle que sempre me incentivou e me protegeu e que apesar de todos os desentendimentos que tivemos, sempre esteve ao meu lado.

Ao Eduardo que me acompanhou em todos esses anos de curso e que compartilhou todos os momentos nessa etapa da minha vida.

A professora e amiga Luciene Correa Lima, a qual admiro por sua competência, e que dedicou seu tempo e paciência para me ajudar a conduzir este trabalho.

A Daniele Conceição que me ensinou as técnicas laboratoriais.

A professora Hedda Kolm pelo incentivo e por disponibilizar seu laboratório sempre quando precisei.

Ao meu cachorro Elvis que o pouco que viveu comigo me trouxe muitas alegrias e será inesquecível no meu coração. A Jade que está tornando meus dias mais felizes.

Aos amigos e colegas que fiz durante o curso.

Obrigada a todos!

## RESUMO

Algumas bactérias naturalmente presentes no ambiente aquático são responsáveis por patologias tanto nos animais quanto em humanos; Dentre essas bactérias, destaca-se o gênero *Vibrio*, em que algumas espécies, tais como *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* podem causar danos à saúde do homem. A vibriose pode ser facilmente adquirida por meio do consumo de frutos do mar, com destaque para moluscos bivalves, pois são animais filtradores e retem micro-organismos em seu interior. Apesar da importância dessas bactérias para a saúde pública, ainda não há muitos estudos relacionados à sanidade de ostras em cultivo no Litoral do Paraná. Este trabalho registrou a ocorrência de *Vibrio* spp. nas águas no cultivo de ostras nativas (*Crassostrea* spp.) em 2 pontos distintos, "Berçário" (B) e "Engorda" (E), localizados na Ponta Oeste da Ilha do Mel, Paranaguá, PR. As amostras de água foram analisadas quinzenalmente, entre os meses de novembro de 2013 a janeiro de 2014, das quais 0,1mL eram inoculadas em meio ágar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS) e incubadas a  $33\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h. Após a identificação fenotípica dos isolados foram feitas a contagem e a categorização das colônias conforme a sua utilização da sacarose do meio. Transferidos para o meio ágar soja tripticase (TSA), os isolados suspeitos foram submetidos à coloração de Gram e a testes de oxidase, catalase, motilidade, sulfeto e indol. Durante o experimento, os valores médios de pH, temperatura e salinidade da água de cultivo foram de 7,9,  $25^{\circ}\text{C}$  e 25, respectivamente. O total de colônias suspeitas isoladas foi de 31 para cada um dos dois pontos de amostragem. Destes suspeitos, foram confirmadas como *Vibrio* spp., 8 e 10 isolados nas áreas E e B, respectivamente. Não houve diferença entre as médias dos confirmados, considerando  $p\leq 0,05$ . A contagem de *Vibrio* spp. variou de  $10\times 10^3/\text{L}$  a  $60\times 10^3/\text{L}$  de água. Este estudo mostrou que, na Ponta Oeste, o gênero *Vibrio* está presente, com maior quantidade de espécies não fermentadoras de sacarose, aproximadamente 75%, dentre as quais podem ser incluídas *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, espécies relevantes à saúde pública.

**Palavras chave:** *Vibrio* spp., Sanidade Aquícola, Bacteriologia, Aquicultura.

## ABSTRACT

Some bacteria naturally present in the environment such as the genus *Vibrio* are responsible for a variety of diseases in both animal and human beings. From the *Vibrionaceae* family, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* can specially cause serious diseases to humans; These pathogens are usually acquired by the consumption of seafood, mainly bivalve molluscs. Despite the importance of these bacteria to public health, few researches on the sanitary aspects of oysters farmed in Paraná State have been published. This study reported the occurrence of *Vibrio* spp. in waters of a marine farm located in Ponta Oeste, Ilha do Mel, Paranaguá, PR, from November 2013 to January 2014. The water samples were collected at every two weeks, from two distinct areas within the *longlines* of the oysters (*Crassostrea* spp), termed berçário (B) and engorda (E). From the samplings, 0.1 mL were inoculated in tiosulfate citrate bile salts and sucrose medium (TCBS agar) and incubated at  $33\pm 3$  °C for 24h. The visible grown colonies, called *suspects*, were then counted and sorted according to their use of sucrose. Transferred to triptone soy agar (TSA) and incubated at  $33\pm 1$  °C for 24h, five isolates per plate were submitted to Gram stain, oxidase, catalase, sulfur reduction, indole production e motility tests. During the trial, pH, temperature and salinity, measured in the sampling sites, were 7.9, 25° C and 25, respectively. From the 31 bacteria *suspects* isolated from each sampling area, 8 colonies in Band 10 colonies in E were confirmed as *Vibrio* spp, which had no significant differences at  $p\leq 0.05$ . The amount of *Vibrio* spp. per volume of water was  $10\times 10^3/L$  to  $60\times 10^3/L$ . This study indicates that among the *Vibrio* spp. found in the oyster farm at Ponta Oeste, the major species isolated (approximately 75%), do not use sucrose. Among those can be *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*, species of great relevance to the public health.

**Keywords:** *Vibrio* spp., Aquaculture health, Bacteriology.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                           | 1  |
| 1.1 O GÊNERO VIBRIO E SUAS IMPLICAÇÕES         | 2  |
| 1.1.1 Vibriose e saúde pública                 | 2  |
| 1.1.2 Vibriose e saúde aquícola                | 3  |
| 1.2 LEGISLAÇÃO                                 | 5  |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b>                        | 6  |
| <b>3. OBJETIVO GERAL</b>                       | 7  |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                      | 7  |
| <b>4. ÁREA DE ESTUDO</b>                       | 8  |
| <b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>                   | 9  |
| 5.1 AMOSTRAGENS                                | 9  |
| 5.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS                | 10 |
| 5.2.1 Testes Presuntivos                       | 12 |
| 5.2.1.1 TCBS                                   | 12 |
| 5.2.1.2 Coloração de Gram                      | 12 |
| 5.2.1.3 Oxidase                                | 12 |
| 5.2.1.4 Catalase                               | 13 |
| 5.2.2 Provas Bioquímicas Adicionais            | 13 |
| 5.2.2.1 Sulfeto, Motilidade e Indol (Meio SIM) | 13 |
| 5.3 ANÁLISES DOS RESULTADOS                    | 14 |
| <b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>               | 15 |
| <b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                 | 27 |
| <b>8. CONCLUSÃO</b>                            | 28 |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>           | 29 |



## 1. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho possui uma série de micro-organismos que ocorrem naturalmente na água e em animais de origem aquática, sendo alguns deles patogênicos, tanto para animais quanto para humanos, a exemplo de bactérias da família *Vibrionaceae*. Desta família, um gênero que se destaca é o *Vibrio*, onde se incluem mais de 30 espécies com, pelo menos 12 sendo patogênicas para o homem e associadas a doenças transmitidas por alimentos (DALMASSO *et al.*, 2009). Nos últimos 30 anos várias espécies de *Vibrio* são proclamados como vetores de doenças transmitidas ao homem (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2004).

Os vibrios ocorrem em regiões marinhas tropicais e temperadas, desenvolvem-se bem em temperaturas entre 20 a 25°C, apresentando crescimento diretamente proporcional a temperatura. Em temperaturas mais baixas, eles permanecem em sedimentos no fundo do mar em concentrações menores, insuficientes para causar infecções (RAMOS, 2012). Apresentam morfologia predominantemente de bastonetes retos ou curvos, são anaeróbicos facultativos, Gram-negativos e medem entre 0,5 a 0,8µm de diâmetro e 1,4 a 2,4µm de comprimento. A maioria das espécies patogênicas é móvel, possuindo flagelo único e polar, produzem enzimas oxidase e catalase e fermentam glicose sem produzir gás (LIMA, 2007). O gênero *Vibrio* tem importância na aquicultura diretamente, com potencial de trazer grandes prejuízos econômicos em qualquer estágio de criação, sobretudo na produção de camarões, pois mesmo que os vibriosse encontrem naturalmente presentes no ambiente aquático, desencadeiam infecções quando associados a condições ambientais desfavoráveis de temperatura e salinidades, por exemplo, que influenciam diretamente na multiplicação dessas bactérias (CERICATO, 2012).

## 1.1 O GÊNERO VIBRIO E SUAS IMPLICAÇÕES

### 1.1.1 Vibriose e saúde pública

Doenças microbianas de origem alimentar ou toxinfecções alimentares constituem um grupo de doenças, no qual o alimento contaminado é o mais importante veículo do agente patogênico (PAIVA *et al.*, 2000). Estas enfermidades são contraídas devido à ingestão de alimentos microbiologicamente contaminados ou contendo toxinas indesejáveis pelo organismo. Várias espécies de *Vibrio* são patogênicas para o homem, para os peixes e outros organismos marinhos, porém, entre as de maior importância para a saúde pública destacam-se o *V.cholerae*, responsável por sete pandemias, juntamente com *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, responsáveis pela maioria dos surtos de doenças veiculadas por alimentos (MATTÉ, 2003). A cólera causada por *Vibrio cholerae* tipo 01 ou 0139, é considerada a doença mais comum entre as vibrioses, pode provocar diarreias aquosas severas seguidas de vômito, podendo causar desidratação grave nos pacientes, levando a morte em poucas horas se não tratada devidamente. Ocorre em lugares onde o saneamento, segurança alimentar e higiene não são adequados, e pode se propagar rapidamente (Surto de Cólera, OMS, 2006). Em 1999, no município de Paranaguá, PR, foram registrados centenas de casos confirmados de cólera. A principal hipótese sobre a origem desse patógeno foi à água de lastro dos navios vindo de regiões endêmicas (HASEGAWA *et al.* 2013). Na vibriose por *Vibrio parahaemolyticus*, causador de gastroenterites severas, os sintomas apresentados são: dores epigástricas, náuseas, vômito, diarreia e por vezes evacuações mucosas e sanguinolentas, podendo ainda ser acompanhada por febre (PIRES, 2011). A espécie *V. vulnificus*, considerada a mais perigosa por alguns pesquisadores, por sua alta taxa de mortalidade (em torno de 60%) em pacientes não tratados ou com imunidade enfraquecida (LINKOUS *et al.*, 1999), pode ser adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, mais é sobretudo mais perigosa quando há feridas expostas em contato com água salgada, podendo acarretar infecções severas, caracterizadas por febre e calafrios, seguidas de queda de pressão arterial (choque séptico) e rompimento de lesões da pele (FERREIRA,

2013). Há também outras espécies de vibrios consideradas patógenos oportunistas, tais como *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. alginolyticus*.

A atenção no consumo de alimentos oriundos do mar deve ser redobrada quando se trata de moluscos bivalves que, por serem animais filtradores, funcionam como agentes potenciais de vibrioses. Ostras e mexilhões quando filtram águas contaminadas não apresentam sinal externo de contaminação, como mudança de cor e sabor ou odor ruim. No entanto, ao serem ingeridos crus ou mal cozidos, veiculam infecções severas e até fatais. Em termos de saúde pública, considerando surtos de doenças relacionadas com o consumo de frutos do mar, é importante e necessária a adoção de medidas preventivas para o controle de veiculação dos agentes. Essas medidas incluem: a seleção e conhecimento da área de captura ou cultivo desses organismos (área selecionada de águas livres de contaminação); a depuração após captura; o controle de água e algas que as ostras usam como alimento (EYLES, 1984).

Nos últimos anos, com a popularização dos alimentos típicos da culinária nipônica, houve aumento do consumo do pescado cru, gerando mais preocupação com a qualidade higiênico-sanitária do pescado, de sua preparação e local de estocagem, uma vez que este pescado cru pode ser veículo de agentes transmissores de toxinfecções alimentares (MARTINS, 2006)

#### 1.1.2 Vibriose e saúde aquícola

O manejo sanitário na aquicultura é extremamente importante, pois essa prática, junto ao controle de parâmetros ambientais do cultivo, pode reduzir possíveis contaminações microbiológicas capazes de comprometer diretamente os animais cultivados. Nos últimos anos as doenças infecciosas no cultivo de camarões marinhos tiveram um efeito devastador, causando colapso na produção em países produtores representando grandes perdas à indústria aquícola. As enfermidades passaram a ser vistas como obstáculo econômico e uma ameaça à viabilidade da atividade (NUNES, 2002). Na produção de pós-

larvas de camarões, bactérias de gênero *Vibrio* são uma das principais causas de mortalidades (BESERRA DA SILVA, 2012). Na verdade, a vibriose afeta todos os estágios de vida do camarão, mas pode trazer mortalidade de 100% na larvicultura (MENDES, 2009). Vibrios desencadeiam infecções principalmente quando relacionados à fatores estressantes presentes no ambiente de produção, como alta densidade populacional e variações na qualidade de água, manuseio impróprio do estoque, lesões na cutícula do animal, entre outros, assim influenciando a susceptibilidade do hospedeiro à ação das bactérias, bem como no potencial patogênico destas. Os sinais clínicos dos camarões contaminados por vibrios são lesões ou necrose dos tecidos, retardo no crescimento, comprometendo metamorfoses larvais (LIMA, 2007).

De forma semelhante à carcinicultura, no cultivo de peixes a presença de *Vibrio* spp. também pode trazer prejuízos à produção. Peixes acometidos por vibriose podem apresentar sinais clínicos similares aos de crustáceos como perda de apetite, natação errática e necrose de pele, além de alterações patológicas no trato intestinal, brânquias, coração, fígado e rins (SILVA, 2003).

A vibriose em moluscos bivalves é de particular interesse na aquicultura, não por afetar diretamente os animais, mas por ser um perigo potencial para quem consome esse alimento *in natura* ou mal cozido. A alimentação dos moluscos bivalves se dá por processo de filtração de partículas ou de microorganismos em suspensão na água. Os moluscos concentram esses microorganismos em seus tecidos, permitindo a retenção e acúmulo de bactérias patogênicas (PRUZZO *et al.*, 2005). Assim, a segurança microbiológica dos moluscos depende das condições físicas, químicas e microbiológicas do ambiente de origem, do manuseio e tecnologia pós-captura. É indispensável, portanto, o controle sanitário eficiente da malacocultura quanto ao monitoramento das águas de cultivo.

A depuração de moluscos bivalves é uma alternativa para garantir a salubridade desses alimentos para o consumo humano, prática que é obrigatória em alguns países. A depuração é um método que reduz os níveis de bactérias presentes na carne dos moluscos diminuindo seu potencial infeccioso (CORRÊA *et al.*, 2007). Há evidências de preocupações com a contaminação pelo *Vibrio parahaemolyticus* de alimentos marinhos mesmo

após estocagem prolongada, já que há indicação de que o micro-organismo pode permanecer viável em ostras congeladas por um período superior a 130 dias (JONHSON, 1973)

## 1.2. Legislação

A qualidade bacteriológica dos pratos à base de pescado é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelecendo que a carne de moluscos bivalves *in natura*, resfriada ou congelada, está apta para o consumo humano quando no produto, *Salmonella* sp. estiver ausente em 25g. O limite máximo permitido de *Vibrio parahaemolyticus* é apenas estabelecido para pratos prontos a base de pescado, sendo este de 10<sup>3</sup>/g. Os limites de micro-organismos tolerados pela RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 12/01 do Ministério da Saúde, para moluscos bivalves *in natura*, resfriados ou congelados, referem-se apenas aos moluscos não consumidos crus, apesar de, na prática, o consumo de bivalves ocorra predominantemente *in natura*.

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 esse programa as responsabilidades foram divididas entre o MPA, responsável pelo monitoramento de micro-organismos e de biotoxinas marinhas, e entre o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual ficou responsável por fiscalizar e inspecionar indústrias processadoras de moluscos bivalves certificadas pelo MPA. Até o momento os únicos micro-organismos previstos para monitoramento por esse programa são bactérias *Escherichia coli*. A Resolução 357 do CONAMA prevê as condições e padrões dos corpos d'água, bem como a sua classificação, porém não há nenhuma legislação vigente para *Vibrio* spp.

## 2. JUSTIFICATIVA

As bactérias do gênero *Vibrio* são de grande importância tanto para a aquicultura quanto para a sanidade pública, porém não há muitos registros na literatura sobre estudos referentes a essas bactérias no litoral Paranaense. Os moradores da região da Ponta Oeste têm como principal fonte de renda as ostras *Crassostrea* spp. provenientes do cultivo em *longlines* instalados nesta região. Essas ostras são comercializadas e distribuídas para diversas regiões do litoral paranaense e para SP. Sabendo da importância de obter ostras microbiologicamente seguras, este trabalho se torna tão importante, tanto para a população local quanto para turistas que frequentam as regiões litorâneas do Paraná. O trabalho de levantamento e caracterização de *Vibrio* spp. presentes na água onde estão situadas as ostreiculturas pode dar informações úteis que cheguem as autoridades sanitárias e, em consequência disso, estes possam promover melhorias que beneficiem a aquicultura local, favorecendo a comunidade residente bem como os seus visitantes.

Este trabalho dará continuidade às pesquisas sobre *Vibrio* spp. no litoral do Paraná, iniciadas há poucos anos, pelo Centro de Estudos do Mar (CEM) – UFPR, tendo como objetivo principal promover o litoral paranaense salientando seu grande potencial para a maricultura. Para a quantificação de *Vibrio* spp. foram conduzidas várias técnicas microbiológicas de laboratório, colocando em prática o conteúdo de disciplinas efetuadas no curso de Tecnologia em Aquicultura.



### 3. OBJETIVO GERAL

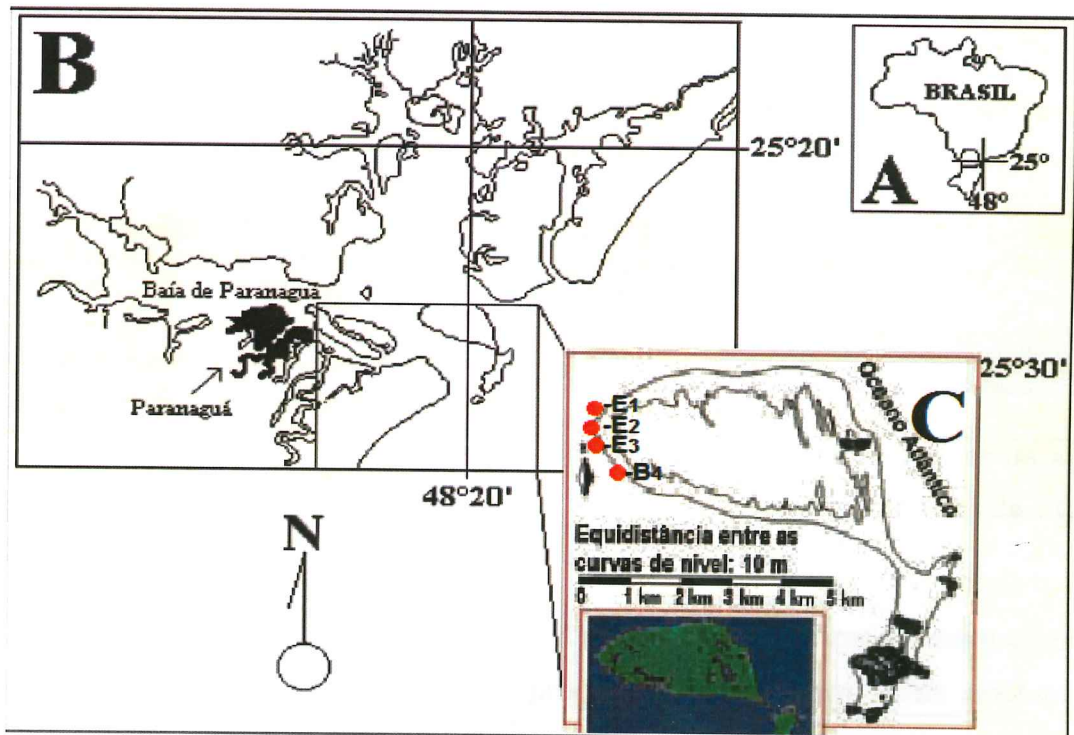
Investigar a presença de *Vibrio* spp. em águas de um cultivo de ostras nativas (*Crassostrea* spp.) na região da Ponta Oeste, Ilha do Mel, Paraná, como complemento à avaliação da saúde microbiológica dos bivalves ali cultivados.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias do gênero *Vibrio* nas águas de 2 áreas distintas do cultivo de ostras da Ponta Oeste;
- Identificar e quantificar colônias de acordo com sua utilização de sacarose no meio de cultura;
- Complementar o estudo sobre a incidência de *Vibrio* spp. em ostras cultivadas na Ponta Oeste, para possibilitar comparação posterior da saúde microbiológica desses bivalves em relação à água de cultivo.

#### 4. ÁREA DE ESTUDO

O local escolhido foi a Ponta Oeste, Ilha do Mel situada na Baía de Paranaguá, isolada pela estação ecológica, onde se encontra o cultivo de ostra nativa *Crassostrea* spp. (figuras 1 e 2). A região da Ilha do Mel é uma importante área turística e possui frequente tráfego de embarcações. A comunidade da Ponta Oeste é composta por 4 famílias [aproximadamente 30 moradores], que residem em casas simples à beira mar. Em meados dos anos 80 a região era habitada por mais moradores, havendo ali, inclusive, uma escola primária em funcionamento. Basicamente, os encarregados da ostreicultura são duas famílias de pescadores, que viram esta atividade como uma oportunidade de complementação de renda. O cultivo é composto por 8 *longlines* com 600 lanternas de ostras no total, na área apelidada de "Engorda". Cada lanterna abriga, em média, 120 ostras. O ciclo do cultivo é de aproximadamente 7 meses.

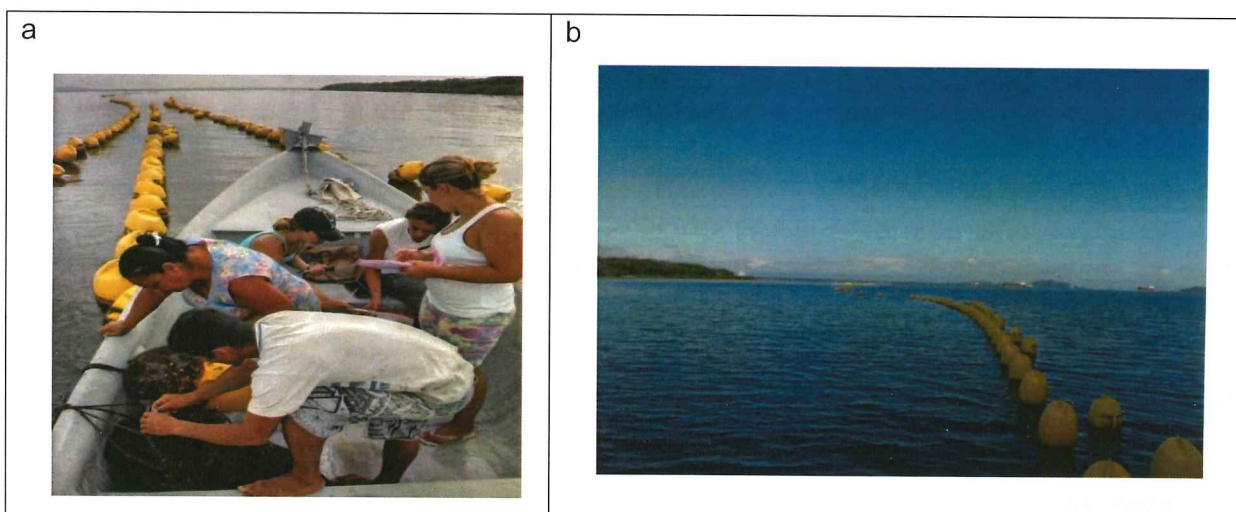


**Figura 1-** Mapa do Brasil (A); Detalhamento do Complexo Estuarino de Paranaguá (B); Ilha do Mel indicada no retângulo menor (C). Os círculos à esquerda da figura em C indicam os pontos de amostragem (Berçário e Engorda) de água para a pesquisa de *Vibrio* spp. na Ponta Oeste.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 AMOSTRAGENS DE ÁGUA

As amostragens de água foram realizadas quinzenalmente em duas áreas distintas, ao longo dos *longlines* de lanternas com ostras na região da Ponta Oeste, Ilha do Mel, PR, entre o final da primavera de 2013 até o verão em 2014. Os pontos denominados E1, E2 e E3 são pontos de amostragem (repetições) na área Engorda (E) das lanternas de ostras, enquanto o ponto 4, na área chamada de Berçário (B) pelos moradores, é não só onde estão as sementes, mas é também o local onde são deixadas as lanternas de “ostras limpas”, isto é, pré-raspadas e prontas para serem comercializadas. Para a padronização dos pontos de amostragem ao longo do estudo, as boias de referência foram identificadas com fita colorida de nylon.



**Figura 2-** Recolhimento de amostras e medição de variáveis físico-químicas da água na ostreicultura (a) e vista panorâmica dos *longlines* na área Engorda (E) da Ponta Oeste, Ilha do Mel, Baía de Paranaguá, PR (b).

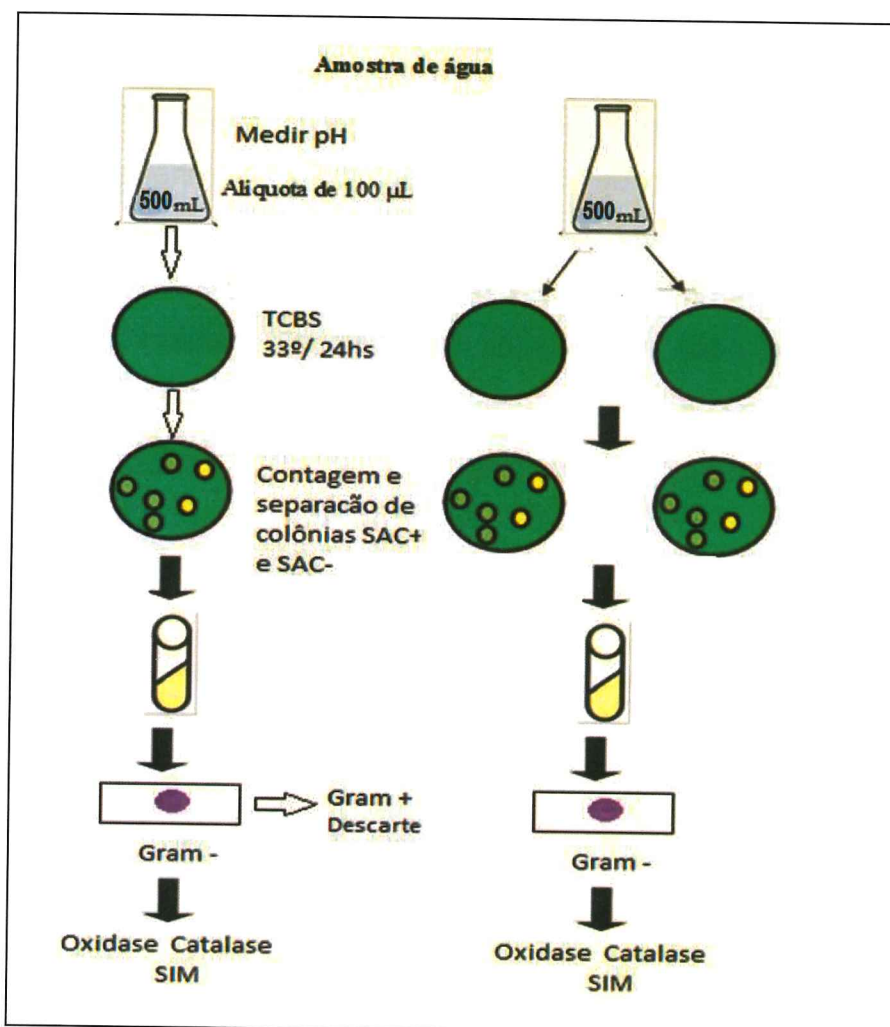
O horário de início e fim das amostragens foi padronizado, assim como a ordem em que foram realizados os procedimentos. Foram feitas anotações gerais sobre o clima do dia de trabalho, condição da maré, da presença de elementos ou fatos peculiares, dentre outras observações relevantes ao estudo. Mediu-se *in loco* a salinidade (com refratômetro *Instrutherm* – modelo RTS 101 ATC) e a temperatura da água (com termômetro de vidro e coluna de mercúrio). Em seguida foram coletados 500mL de água, a uma profundidade

média de 60 centímetros, em recipientes de vidro previamente esterilizados, os quais foram mantidos em caixas isotérmicas até a chegada aos laboratórios de análises (Laboratório de Sanidade Aquícola e Laboratório de Microbiologia do CEM – UFPR). Imediatamente, após a chegada do campo o pH era medido, com medidor digital portátil (*PHTeck* – pH100).

## 5.2. PROCEDIMENTO LABORATORIAL

No Laboratório de Microbiologia, sob condições assépticas, as amostras de água foram processadas, em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com luz ultravioleta por 15-20 minutos. Após homogeneização das amostras, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL de água 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. De cada um dos tres pontos “PE” foi semeada uma placa TCBS, enquanto do ponto “PB”, foram duas placas. As placas foram, em seguida, incubadas a  $33 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas em estufa bacteriológica (*Quimis* – modelo Q316M2), para posterior leitura, classificação e contagem das colônias. As colônias crescidas foram contadas no seu total e classificadas conforme a utilização da sacarose do meio, ou seja, colônias amarelas são sacarose positivas (SAC<sup>+</sup>), denominadas assim pela sua capacidade de fermentação do açúcar e colônias esverdeadas, não fermentadoras do açúcar, como sacarose negativas (SAC<sup>-</sup>). Na sequência, 5 colônias por placa foram selecionadas e transferidas para o meio Agar Soja Trypticase, TSA (*Himedia Labs*, Índia) enriquecido com 2% de NaCl, e incubadas a  $33 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas para posterior realização dos testes presuntivos adicionais, provas bioquímicas e estocagem dos isolados (Figura 3).





**Figura 3-** Sequência do processamento das amostras de água para as áreas Berçário (à esquerda) e Engorda (à direita).

Os meios de cultura foram preparados no Laboratório de Sanidade Aquícola, em placas estéreis e descartáveis, a partir de formulações comerciais conhecidas. Padrões de referência *Vibrio cholerae* (ATCC 19522), *Vibrio mimicus* (ATCC 35653) e *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) foram usados para validação dos meios de cultura e demais provas usadas na identificação de isolados suspeitos. Os testes bioquímicos utilizados para identificação desses isolados foram Oxidase, Catalase, Sulfeto, Motilidade e Indol, detalhados a seguir.

## 5.2.1 Testes Presuntivos

### 5.2.1.1 TCBS

O Agar TCBS é um meio utilizado para a seleção e diferenciação de colônias de bactérias do gênero *Vibrio*, em que o extrato de levedura e a peptona fornecem nitrogênio e vitamina para o crescimento das colônias. O citrato de sódio, tiosulfato de sódio, bile bovina e colato de sódio são agentes seletivos que permitem a alcalinidade do pH, que inibe organismos Gram-positivos e suprime os coliformes. O pH do meio é aumentado para potenciar o desenvolvimento do *Vibrio cholerae*, já que este é sensível a ambientes ácidos e com a elevada concentração de sódio favorece ainda mais este desenvolvimento pois esse organismo entre outros da espécie *Vibrio* são, em sua maioria, halófilos. A classificação de colônias crescidas no TCBS, é feita conforme a sua utilização de sacarose do meio, identificadas de acordo com sua coloração, ou seja, colônias amarelas, devido a fermentação do açúcar são classificadas como sacarose positiva (SAC <sup>+</sup>), e colônias esverdeadas como sacarose negativa (SAC <sup>-</sup>) não fermentadoras do açúcar.

### 5.2.1.2 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi efetuada com um kit de químicos (*Laborclin* Pinhais, PR), em bactérias puras e recém-crescidas (24h) em meio TSA com 2% de NaCl. Após coloração, a leitura das lâminas foi feita com objetiva de imersão, em microscópio óptico (*Carl Zeiss Primostar*, Germany). Os isolados suspeitos foram triados conforme o resultado de sua morfologia (bastonetes) e cor das colônias, sendo estas Gram-negativas quando avermelhadas e Gram-positivas quando roxo/azuladas. Bactérias Gram positivas foram imediatamente descartadas.

### 5.2.1.3 Oxidase

O teste de oxidase é baseado na enzima citocromo oxidase, que é um complemento proteico transmembranar, relacionado à cadeia respiratória de



alguns micro-organismos. O teste tem como principal finalidade distinguir de bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (oxidase positiva) de enterobactérias (oxidase negativa). Para o teste de oxidase foram utilizadas tiras de papel embebidas em reativo de indofenol, prontas para uso (*Newprov*, Pinhais, PR). Com uma alça bacteriológica, uma porção da colônia bacteriana foi transferida para a tira teste friccionando-a. Dentro de alguns segundos foi observada o desenvolvimento ou não de coloração da tira; A cor azul/roxo significa oxidase positiva e a não mudança de coloração indica que a bactéria é oxidase negativa.

#### 5.2.1.4 Catalase

A catalase é uma enzima intracelular que decompõe peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) com a formação de água e oxigênio molecular. A prova de catalase tem como função identificar a presença desta enzima na bactéria de interesse. Para execução desse procedimento foi colocada uma porção da colônia bacteriana sobre uma lâmina de vidro limpa e uma gota de  $H_2O_2$  10% (*ADV Farma*, SP) foi adicionada. Após aproximadamente 40 segundos, a formação de bolhas sobre a amostra indica resultado positivo. A não formação de bolhas é considerada resultado negativo.

#### 5.2.2 Provas bioquímicas complementares

##### 5.2.2.1 Meio SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade)

Com auxílio de uma agulha metálica, uma pequena porção da colônia crescida no TSA ( 2% de NaCl) foi retirada e inoculada no meio ágar SIM (Sulfeto, Motilidade e Indol) preparado com 3% de NaCl e incubamos a 33°C por 24hs. Após este período foi realizada a leitura dos tubos. Para sulfeto considera-se positivo os isolados que desenvolvem coloração negra no ágar. Para a prova de motilidade, o resultado positivo foi evidenciado pelo crescimento difuso a partir da linha da picada, tornando o meio turvo. Para prova de Indol 2- 3 gotas do reativo Kovac foram adicionadas à superfície do

meio. Se houver o surgimento de um anel com coloração vermelha indicando que a bactéria possui triptofanase, caracterizando-a como reação positiva, se o anel permanecer com a cor do reagente indica reação negativa de Indol. Bactérias de interesse nesse estudo possuem resultado negativo para sulfeto e positivo para Indol e Motilidade.

### 5.3 ANÁLISES DOS RESULTADOS

Os resultados foram tabulados no programa *Excel* (Microsoft Windows 7) e no programa estatístico *R* (Windows) onde foram submetidos à comparação de médias pelo teste *t* (*Student*) com nível de significância  $p \leq 0,05$ . Foram realizados testes de correlação com o método de *Pearson*, entre colônias totais suspeitas no PE (Engorda) e PB (Berçário), entre colônias sacarose positiva ( $SAC^+$ ) e sacarose negativa ( $SAC^-$ ) com as variáveis físicas e químicas da água. As bactérias confirmadas como *Vibrio* spp. foram calculadas por litro de água.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho são baseados na análise da média das repetições (E1 a E3) da área Engorda (E) e de (B1 e B2) da área Berçário (B) ao longo do tempo, ou seja, das 6 amostragens. Na figura 4 estão os valores médios das variáveis físico-químicas da água.

**Figura 4-** Amplitude (entre parênteses), média e desvio padrão das variáveis físico-químicas da água na área de Engorda (E) e no Berçário (B) da Ostreicultura da Ponta Oeste, Ilha do Mel, PR, ao longo do estudo.

| VARIÁVEIS<br>FÍSICO -<br>QUÍMICOS | ENGORDA (E)             |                          |                         |                                       | BERÇÁRIO (B)            |                          |  |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|--------------------------|--|
|                                   | E 1                     | E 2                      | E 3                     | E                                     | B1                      | B2                       | B                                      |
| TEMPERATURA<br>(°C)               | (24- 28)<br>25,66±1,36  | (23,5- 28)<br>25,25±1,60 | (24- 28)<br>25,18±1,56  | <b>(23,5-28)</b><br><b>25,5±1,5</b>   | (23,5-28)<br>25,66±1,53 | (23,5- 28)<br>25,66±1,53 | <b>(23,5- 28)</b><br><b>25,66±1,53</b> |
| SALINIDADE                        | (22- 30)<br>25,83±3,06  | (29-22)<br>25±2,28       | (22-30)<br>25±2,68      | <b>(22-30)</b><br><b>25,27±2,56</b>   | (22- 29)<br>25,83±2,61  | (22- 29)<br>25,83±2,61   | <b>(22- 29)</b><br><b>25,83±2,61</b>   |
| pH                                | (7,9- 8,0)<br>7,91±0,04 | (7,7- 8,0)<br>7,9±0,10   | (7,8- 8,0)<br>7,93±0,08 | <b>(7,7-8,0)</b><br><b>7,91± 0,07</b> | (7,9- 8,0)<br>7,91±0,07 | (7,9- 8,0)<br>7,91±0,07  | <b>(7,9- 8,0)</b><br><b>7,91±0,07</b>  |

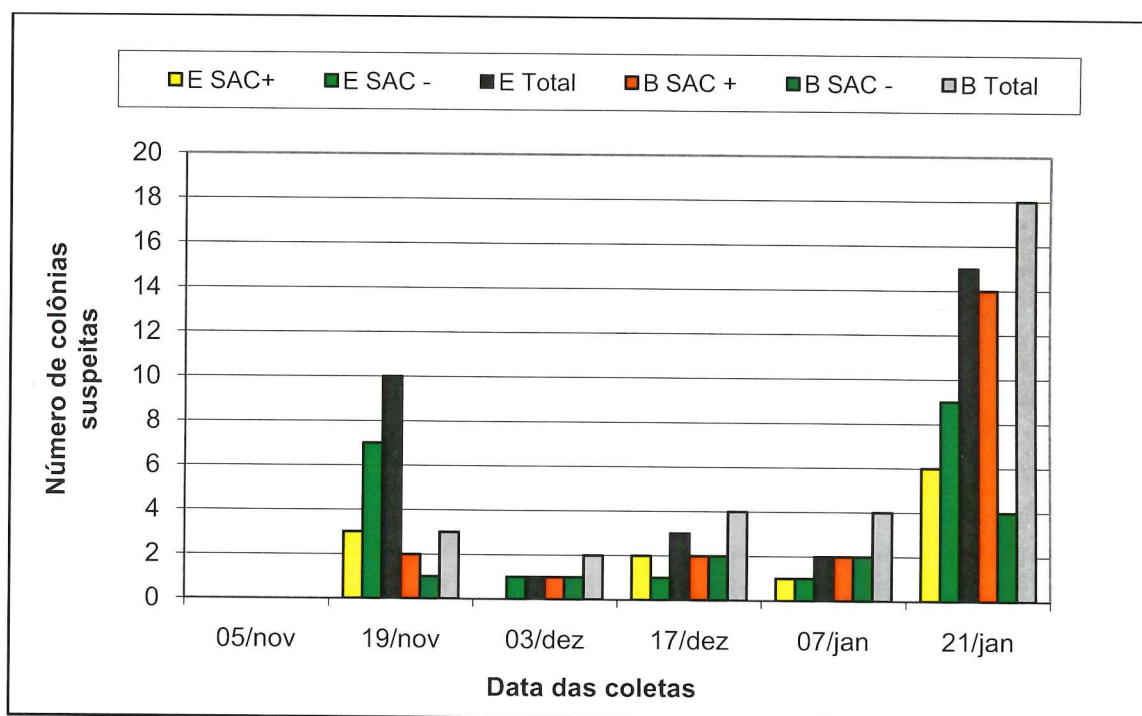
Quase todas as amostragens aconteceram em dias ensolarados com ocorrência de chuvas na véspera. O dia anterior à primeira amostragem foi particularmente de muita chuva, porém, durante a coleta esteve ensolarado, com a maré vazante e presença de vento forte. Na segunda amostragem, havia presença de sol, sem vento e a maré estava vazante. Na terceira amostragem havia sol e calor intensos, com a maré enchendo e sem ventos. Na quarta amostragem havia sol e calor, com a maré vazante e vento. Na quinta amostragem o dia estava nublado, maré vazante sem ventos. Na sexta amostragem havia sol e calor com maré vazante e com a presença de vento. Essas variáveis climáticas estão ilustradas na Figura 5.

|            | Véspera   |   | Dia de coleta de água   |   |  |   |   |   |
|------------|---|---|---|---|--|---|---|---|
|            | Sol   | chuva   | Sol   | Nublado   | chuva  | Maré  |   | vento   |
| Amostragem |  |  |  |  |  |  |  |  |
| A1         | +   | +++   | +   |   |  | +   |   | +   |
| A2         |   | +   | +   |   |  | +   |   | ++  |
| A3         |   | +   | +++   |   |  |   | +   |   |
| A4         |   | +   | ++  |   |  | +   |   | +   |
| A5         |   | +   |   | ++  |  | +   |   | +   |
| A6         |   |   | ++  |   |  | +   |   | +   |
| A6         |   |   | ++  |   |  | +   |   | +   |

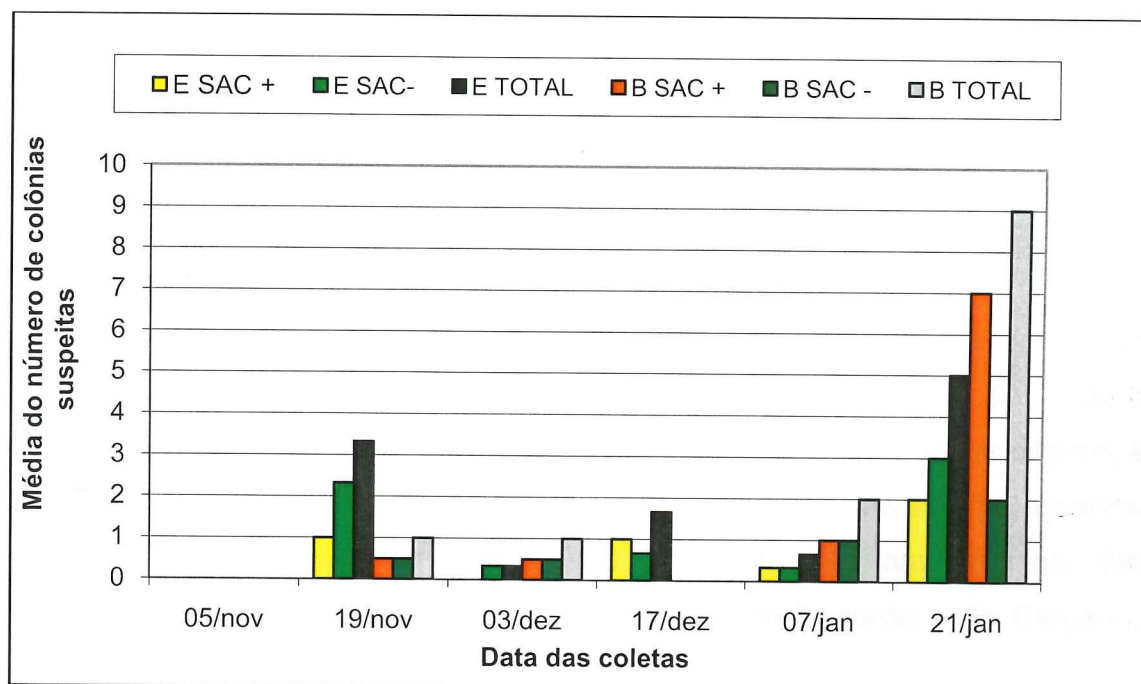
**Figura 5-** Diagrama resumido sobre as condições climáticas na véspera e no dia das amostragens de água do cultivo de bivalves na Ponta Oeste, Ilha do Mel, PR. (+ Fraco ++ Forte +++ Intenso)

No Berçário (B), a salinidade foi, dentre as variáveis ambientais medidas, a que apresentou maior amplitude, de 22 a 30 ( $\sigma = 2,61$ ) em comparação ao pH e temperatura. Nas áreas E e B a mesma amplitude de temperatura (23,5 a 28°C) foi registrada. No caso do pH, foi registrada maior amplitude em E (7,7 a 8,0), entretanto a média e desvio padrão de pH das duas áreas resultou igual. Quando se fez, separadamente por área, a comparação de médias ao longo do tempo, houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) para ambas as áreas, E e B, para as três variáveis ambientais.

O número total de colônias crescidas nas placas de TCBS, denominadas “colônias suspeitas”, é apresentado na figura 6, a seguir.



**Figura 6-** Número absoluto de colônias (*Vibrio* spp.) suspeitas, isoladas da água de cultivo nas áreas Engorda (E) e Berçário (B) da Ponta Oeste, Ilha do Mel, PR, ao longo do tempo. SAC<sup>+</sup> se refere às colônias sacarose positivas e SAC<sup>-</sup> às colônias sacarose negativas.



**Figura 7-** Quantidade média de colônias (*Vibrio* spp.) suspeitas, isoladas da água de cultivo nas áreas Engorda (E) e Berçário (B) da Ponta Oeste, Ilha do Mel, PR, ao longo do tempo. SAC<sup>+</sup> se refere às colônias sacarose positivas e SAC<sup>-</sup> às colônias sacarose negativas.

Na primeira amostragem (05/nov), não foi contada nenhuma colônia, já que não houve crescimento em nenhuma das placas de TCBS. A ausência de crescimento se deveu ou à real falta de bactérias *Vibrio* naquelas amostras de água ou por alguma falha de procedimento no preparo e conservação do meio TCBS, ou ainda pela profundidade de onde foram obtidas as amostras de água, isto é, muito superficial em relação à disposição das lanternas de ostras nos *longlines*. Mesmo com o dia ensolarado e quente, os ventos podem ter contribuído para a maior movimentação das águas no cultivo, dispersando os micro-organismos, condições essas que talvez sejam um fator a mais que explique o não crescimento de colônias.

Em relação às médias de colônias totais suspeitas obtidas na Engorda, na 6ª amostragem foi onde se obteve maior número de suspeitos isolados, com um total de 5 colônias, seguida da 2ª amostragem da qual houve crescimento médio total de 3,33 colônias suspeitas (Figura 7). Na comparação entre as médias totais do E ( $p \leq 0,05$ ) ao longo das amostragens não houve diferença significativa. Quanto à capacidade de fermentar a sacarose do meio TCBS (SAC<sup>+</sup> e SAC<sup>-</sup>), a maior média de crescimento de SAC<sup>-</sup> foi 6,65 colônias contra 4,33 colônias SAC<sup>+</sup>. Não houve diferença significativa entre as médias SAC<sup>+</sup> nem entre as médias de SAC<sup>-</sup> quando comparadas ao longo do tempo.

No Berçário, a maior média de colônias suspeitas foi obtida também na 6ª amostragem com um total de 9 suspeitos isolados. Dentre o total de suspeitos não houve diferença significativa ao longo das amostragens ( $p = 0,18$ ). Ao contrário, na Engorda houve maior ocorrência de colônias SAC<sup>+</sup> (total de 9 suspeitos) em relação às colônias SAC<sup>-</sup> (total de 4). Não houve diferença significativa entre SAC<sup>+</sup> e SAC<sup>-</sup> ( $p = 0,2$  e  $p = 0,08$  respectivamente) quando comparadas individualmente nesta área ao longo das amostragens. Na comparação entre as médias totais de suspeitos da Engorda e do Berçário, houve diferença significativa ( $p = 0,02$ ).

Para avaliar a possível influência das condições ambientais na quantidade isolada de colônias suspeitas, estas variáveis foram confrontadas através de testes de correlação, cujos resultados estão nas tabelas 1 e 2.



**Tabela 1-** Correlação entre o número total de colônias suspeitas, entre o número de colônias sacarose positiva (SAC<sup>+</sup>) e entre o número de colônias suspeitas sacarose negativa (SAC<sup>-</sup>) com os parâmetros físico-químicos da água na Engorda (E). Aplicado o teste t de Student a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ). S= significativo, NS= não significativo.

| COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r) |                          |                     |                                     |                      |                                     |                      |
|-------------------------------|--------------------------|---------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Área Engorda (E)              |                          |                     |                                     |                      |                                     |                      |
| Variáveis físico-químicas     | Colônias suspeitas Total | Teste t             | Colônias suspeitas SAC <sup>+</sup> | Teste t              | Colônias suspeitas SAC <sup>-</sup> | Teste t              |
| <b>TEMPERATURA (°C)</b>       | 0,84                     | P=0,03<br><b>S</b>  | 0,77                                | P=0,69<br><b>N.S</b> | 0,77                                | P=0,03<br><b>S</b>   |
| <b>SALINIDADE</b>             | -0,029                   | P=09<br><b>N.S</b>  | -0,05                               | P=0,92<br><b>N.S</b> | -0,051                              | P=0,92<br><b>N.S</b> |
| <b>pH</b>                     | -0,37                    | P=046<br><b>N.S</b> | -0,17                               | P=0,73<br><b>N.S</b> | -0,17                               | P=0,73<br><b>N.S</b> |

**Tabela 2-** Correlação entre o número total de colônias suspeitas, entre o número de colônias sacarose positiva (SAC<sup>+</sup>) e entre o número de colônias suspeitas sacarose negativa (SAC<sup>-</sup>) com os parâmetros físico-químicos da água no Berçário (B). Aplicado o teste t de Student a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ). S= Significativo, NS= Não significativo.

| COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r) |                           |                    |                                     |                    |                                     |                    |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------|
| Área Berçário                 |                           |                    |                                     |                    |                                     |                    |
| Variáveis físico-químicas     | Colônias totais suspeitas | Teste t            | Colônias suspeitas SAC <sup>+</sup> | Teste t            | Colônias suspeitas SAC <sup>-</sup> | Teste t            |
| <b>TEMPERATURA (°C)</b>       | 0,84                      | 0,03<br><b>S</b>   | 0,82                                | 0,04<br><b>S</b>   | 0,81                                | 0,04<br><b>S</b>   |
| <b>SALINIDADE</b>             | 0,21                      | 0,68<br><b>N.S</b> | -0,18                               | 0,71<br><b>N.S</b> | -0,27                               | 0,59<br><b>N.S</b> |
| <b>pH</b>                     | 0,52                      | 0,28<br><b>N.S</b> | 0,52                                | 0,28<br><b>N.S</b> | 0,47                                | 0,34<br><b>N.S</b> |

Apesar de, praticamente, todas as datas de amostragem terem coincidido com dias ensolarados e com alguma ocorrência de chuva no dia anterior, na última amostragem (A6), em que não houve incidência de chuva na região da Baía de Paranaguá, houve maior crescimento de colônias suspeitas nas placas de TCBS (33 colônias totais). As amostragens foram realizadas no final da primavera até metade do verão, em que a temperatura da água aumentou gradativamente com o passar do tempo, o que pode ter influenciado diretamente na quantidade de colônias isoladas nas placas de TCBS. O desenvolvimento do gênero *Vibrio* é favorecido por temperaturas de 20 a 25°C apresentando crescimento diretamente proporcional a temperatura (RAMOS, 2012), o que é compatível com os achados deste estudo. A área Engorda possui maior influência das marés, com maior movimentação da água, em comparação com o Berçário, o qual está situado bem mais perto da praia, cerca de 50m, e bem de frente para as residências dos moradores da Comunidade da Ponta Oeste. Assim, a localização pode, também, ter influenciado no maior número de colônias crescidas em B que em E. Além de funcionar como local de crescimento das sementes antes de serem transferidas para a área Engorda, a área Berçário, também abriga lanternas de ostras pré-raspadas (denominadas de "limpas" pelos aquicultores), vindas da Engorda e em tamanho de comercialização. A presença dessas lanternas também constituiu-se em fator de proliferação e manutenção potencial de *Vibrio* spp. O meio de cultura seletivo TCBS é largamente utilizado para cultivo de vibriónáceos, porém não garante em 100% que somente o gênero *Vibrio* ali se desenvolva. O crescimento de bactérias oportunistas, como *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* e *Pseudomonas* spp. podem ocorrer no TCBS, inclusive com as mesmas características fenotípicas de *Vibrio* spp. Outro gênero oportunista que pode produzir colônias no meio TCBS é *Proteus*, utilizador do sulfeto, quando inoculado no meio de cultura SIM, resultando na coloração negra deste meio. O teste do sulfeto, é particularmente importante na triagem de bactérias *Vibrio*, uma vez que estas são sulfeto negativas. Bactérias sulfeto positivas não apareceram nesse estudo. Para evitar equívocos no isolamento e classificação de bactérias verdadeiramente *Vibrio*, as provas bioquímicas adicionais, que foram efetuadas neste estudo, como os testes de oxidase, catalase, sulfeto, indol e motilidade, são essenciais. Isto pode ser

constatado quando, finalmente, se obtém, *Vibrio* spp. confirmadas. Desse modo, as colônias suspeitas passaram pela primeira grande triagem, que é a coloração de Gram, em que bactérias positivas e em formatos diferentes de bastonetes foram descartadas e não foram testadas bioquimicamente. O total de 5 colônias foram descartadas nesta etapa do processo de identificação.

Na Engorda, do total de 31 colônias suspeitas isoladas, 8 foram confirmadas *Vibrio* spp., sendo 2 SAC<sup>+</sup> e 6 SAC<sup>-</sup>. No Berçário também foram isoladas 31 colônias suspeitas, das quais 10 foram confirmadas *Vibrio* spp. sendo 2 SAC<sup>+</sup> e 8 SAC<sup>-</sup>. A quantificação de *Vibrio* spp. confirmados por volume de água está nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 3-** Quantidade de colônias confirmadas *Vibrio* spp. por volume inoculado (Vbr/100µL) nas três repetições (1,2,3) e por litro de água (Vibr/L) na área Engorda (E) da Ostricultura da Ponta Oeste, Ilha do Mel, PR. Comparação de valores entre colunas, considerando  $p \leq 0,05$ . (S = Significativa e NS = Não significativa; dp= desvio padrão)

| Colônias confirmadas <i>Vibriospp.</i> por volume de água, na área Engorda |                  |   |                  |  |                  |  |                                       |
|--|------------------|---|------------------|--|------------------|--|---------------------------------------|
| Amostragens  | Vbr/100µL<br>(1) | Vibr/L                                    | Vbr/100µL<br>(2) | Vibr/L                                     | Vbr/100µL<br>(3) | Vibr/L                                   | Média±dp de<br>1,2 e 3 (por<br>100µL) |
| A1   | 0                | 0   | 0                | 0  | 0                | 0  | 0±0 NS                                |
| A2   | 0                | 0   | 0                | 0  | 0                | 0  | 0±0 NS                                |
| A3   | 0                | 0   | 0                | 0  | 0                | 0  | 0±0 NS                                |
| A4   | 0                | 0   | 0                | 0  | 0                | 0  | 0±0 NS                                |
| A5   | 0                | 0   | 1                | 10x10 <sup>3</sup>                         | 1                | 10x10 <sup>3</sup>                       | 0,67±0,57NS                           |
| A6   | 1                | 10x10 <sup>3</sup>                        | 3                | 30x10 <sup>3</sup>                         | 2                | 20x10 <sup>3</sup>                       | 2±1 NS                                |
| Média ± dp   | 0,14±0,40        | 16x10 <sup>2</sup> ±<br>4x10 <sup>3</sup> | 0,66±1,2         | 6x10 <sup>3</sup> ±<br>121x10 <sup>3</sup> | 0,5±0,8          | 5x10 <sup>2</sup> ±<br>8x10 <sup>3</sup> | 0,44±0,8<br>NS                        |

**Tabela 4-** Quantidade de colônias confirmadas *Vibrio* spp. por volume inoculado (Vbr/100µL) nas três repetições (1,2,3) e por litro de água (Vibr/L) na

área Berçário (B) da Ostreicultura da Ponta Oeste, Ilha do Mel, PR. Comparação de valores entre colunas, considerando  $p \leq 0,05$ . (S = Significativa e NS = Não significativa; dp= desvio padrão)

| Colônias confirmadas <i>Vibrio</i> spp. por volume de água, na área Berçário |                        |                        |  |   |
|--|------------------------|------------------------|--|---|
| Amostragens  | Vbr/100 $\mu$ L<br>(1) | Vbr/100 $\mu$ L<br>(2) | Vibr/L   | Média $\pm$ dp de 1 e 2 (Vbr/100 $\mu$ L) |
| A1   | 0                      | 0                      | 0  | 0 $\pm$ 0 NS                              |
| A2   | 0                      | 0                      | 0  | 0 $\pm$ 0 NS                              |
| A3   | 1                      | 1                      | 20x10 <sup>3</sup>                             | 1 $\pm$ 0 NS                              |
| A4   | 0                      | 0                      | 0  | 0 $\pm$ 0 NS                              |
| A5   | 2                      | 0                      | 20x10 <sup>3</sup>                             | 1 $\pm$ 1,41 NS                           |
| A6   | 4                      | 2                      | 60x10 <sup>3</sup>                             | 3 $\pm$ 1,41 NS                           |
| Média $\pm$ dp   | 1,16 $\pm$ 1,6         | 0,5 $\pm$ 0,8          | 16x10 <sup>3</sup> $\pm$<br>23x10 <sup>3</sup> | 0,83 $\pm$ 1,16 NS                        |

Tanto na Engorda quanto no Berçário não houve diferença significativa entre as médias de *Vibrio* spp. confirmados.

Várias bactérias do gênero *Vibrio* são patogênicas aos seres humanos, podendo acarretar distúrbios variados em seu organismo, desde diarreias até casos de óbito por septicemia (RIBEIRO, 2005). Segundo Shinnel (1981) a vibriose por *V. parahaemolyticus*, muito difundida no Japão, foi responsável por 70% dos surtos causados por toxinfecções alimentares na década de 80. Neste país houve investigações intensivas, durante o verão, nas águas costeiras potencialmente contaminadas, das quais todas resultaram positivas para *V. parahaemolyticus*.

Barros (1977), registrou em ostras da espécie *Crassostrea rizophorae*, oriundas da baía de Sepetiba, Litoral do Rio de Janeiro, contaminação em 100% das amostras, porém com uma população considerada baixa, isto é 3,02 x 10<sup>3</sup> vibriões por grama de amostra.

Ramos (2012) pesquisou a incidência de víbrios marinhos potencialmente patogênicos em ostras da espécie *Crassostrea gigas* e nas águas da Baía Sul do estado de Santa Catarina. De 60 ostras amostradas,

48,3% estavam contaminadas por alguma espécie de *Vibrio*. Dentre as mais frequentes, estavam *V. parahaemolyticuse* e *V. vulnificus*. Por sua vez, de 60 amostras de água analisadas, 73,3% estavam contaminadas por uma ou mais espécies de vibrios. As contagens de *V. parahaemolyticuse* e *V. vulnificus* nas amostras de água do mar, variaram de  $<19,9/L$  a 100 NMP/L, respectivamente. De 106 cepas isoladas, 78,9% foram previamente identificadas como *V. parahaemolyticus*, 18,9% como *V. vulnificus* e 2,8% identificadas como *V. Cholerae*.

Pereira *et al.* (2007) analisaram a incidência de vibrios patogênicos em 40 amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), oriundas de 15 restaurantes da região litorânea da cidade do Rio de Janeiro. Neste, houve isolamento de 178 cepas, das quais *V. vulnificus* foi encontrado em 53% dos estabelecimentos, *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* foram isolados em 75% dos estabelecimentos e o *V. carchariae* foi detectado em 88% dos estabelecimentos. Em 40% dos estabelecimentos estudados, as ostras eram estocadas em temperatura ambiente, condição propícia à multiplicação de espécies de *Vibrio* perigosas para humanos.

Vieira (2002), pesquisou a incidência de *Vibrio* spp. SAC<sup>-</sup> em ostras *C. Rhizophorae*, comercializadas, *in natura*, em 2 barracas de praia, em Fortaleza, CE. As quantidades de *Vibrio* naqueles bivalvos variaram de 93 a 9.300/g e de 150 a 4.300/g .

As amostras de água da ostreicultura da Ponta Oeste resultaram em contagens de *Vibrio* spp. de  $10 \times 10^3/L$  a  $60 \times 10^3/L$ . Das 30 amostras analisadas, 33,3%, também estavam contaminadas por uma ou mais espécies de vibrios, com destaque para espécies não fermentadoras de sacarose (SAC<sup>-</sup>). Apesar de não ter sido determinadas exatamente que espécies seriam dominantes nas amostras de água da Ponta Oeste, pode-se supor que dentre seus isolados SAC<sup>-</sup>, estariam espécies de *V. parahaemolyticus* e de *V. vulnificus*, como encontrado por Ramos (2012).

O primeiro estudo sobre bactérias do gênero *Vibrio* spp. em águas do litoral paranaense, publicado em literatura técnico-científica, foi realizado por Ferreira (2013), que identificou a presença dessas bactérias em águas de 5

pontos distintos no balneário Pontal do Sul, distante aproximadamente, 5 Km da Ilha do Mel, PR. No estudo, Ferreira registrou a presença de vibriões em todos os pontos de amostragem, havendo maior quantidade de *Vibrio* spp. nas águas do Canal do DNOS (estuário, localização -25° 33' 57.05", -48° 21' 19.30") local com maior influência de marés, dentre os pontos analisados, e também, o local com maior trânsito de pessoas, embarcações e residências próximas. Ao contrário dos resultados da Ponta Oeste, no estudo de Ferreira, a maior incidência foi de espécies SAC<sup>+</sup>, onde poderiam figurar espécies de *V. cholerae*.

Outra pesquisa sobre a presença de *Vibrio* spp. em águas da Baía de Paranaguá foi conduzida por Rodaski (2014), em uma área de cultivo de bivalves (ostras e mexilhões), na Vila do Maciel, próxima de Pontal do Sul. Não foram encontradas quantidades significativas de *Vibrios* nas amostras de água, apesar da proximidade dos *longlines* em relação à praia e à Vila propriamente, a qual abriga pelo menos o triplo de pessoas em relação à Comunidade da Ponta Oeste. As amostras de água da Vila do Maciel, coletadas na primavera-verão de 2013, resultaram em maior número de espécies SAC<sup>-</sup>, semelhante à Ponta Oeste.

Trabalho recente de Chalcoski (2014) também conduzido na ostreicultura da Ponta Oeste, na primavera-verão de 2013, resultou na presença de *Vibrio* spp. em 100% das ostras analisadas. As contagens de *Vibrio* foram aumentando conforme o aumento da temperatura ambiental, com quantidades variando de 0 a 469 colônias. Os achados gerais de espécies de *Vibrio* nas ostras de Chalcoski foram semelhantes aos das amostras de água deste estudo no que se refere a maior incidência de *Vibrio* spp. na 6ª amostragem, onde ocorreu maior temperatura e ausência de chuvas. A semelhança dos resultados entre as amostras de ostras e água, corroboram a informação de que a microbiota presente no interior dos bivalvos reflete a situação microbiológica da água onde eles estão instalados.

O monitoramento de parâmetros físico-químicos, bem como da avaliação microbiológica de coleções de água apropriados para instalação ou expansão de cultivos aquícolas, com a identificação prévia de micro-organismos patogênicos, pode prevenir enfermidades relacionadas aos frutos



do mar e garantir a comercialização de produtos seguros para o consumidor. Devido ao crescente aumento da produção de moluscos bivalves no Brasil, torna-se necessário um controle de qualidade cada vez mais exigente, com a finalidade de agregar valor a esses bivalves saborosos e potencialmente perigosos à saúde humana, e que são popularmente consumidos *in natura*. Embora bivalves devam ser cultivados e coletados de águas livres de contaminação fecal, mesmo aqueles despescados ou extraídos legalmente podem estar contaminados por vibriões. Estas bactérias não alteram a aparência, sabor nem odor dos moluscos afetados. Uma vez que o controle de vibriões presentes na água salgada é difícil, algumas estratégias de prevenção da vibriose são adotadas. No caso da malacocultura, a depuração dos bivalves antes da sua comercialização é um procedimento cada vez mais considerado. A depuração consiste em, antes de comercializar, deixar os moluscos despescados em água corrente e limpa, por várias horas, a fim de reduzir a população de micro-organismos filtrados pelos moluscos. Trabalhos conduzidos por pesquisadores do laboratório de Bivalves da Universidade de Auburn (AUSL) mostraram que o aumento do fluxo de água de 11L/m para 68 L/m no processo de depuração, reduziu significativamente a quantidade 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 (LEWIS, 2010)

No leste paranaense algumas comunidades vem implementando cultivos de moluscos bivalves, cuja comercialização se tornou sua fonte de renda. Monitorar esses cultivos é, assim, de grande importância, não só para as comunidades, mas também para os consumidores de tais frutos do mar. O controle sanitário de moluscos bivalves produzidos no Paraná, vem ocorrendo através de uma parceria entre a Associação Guaratubana de Maricultores (AGUAMAR) e a UFPR (*Projeto Cultimar- GIA*), porém o monitoramento de vibrios não tem sido conduzido até então. O foco principal dessa parceria é na avaliação de bactérias coliformes totais, *Salmonella* sp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Mesmo com o cultivo de bivalves em locais livres de contaminação fecal, estes podem estar contaminados por vibriões. O risco das infecções veiculadas por bivalves é maior quando as águas estão

contaminadas e, mais ainda, quando esses frutos do mar são consumidos mal cozidos ou crus, hábitos tradicionalmente vistos entre os consumidores.

O Paraná, tal como seu estado vizinho Santa Catarina, apresenta potencial para expandir a atividade de maricultura e se destacar na produção de moluscos bivalves. Trabalhos de identificação de *Vibrio* spp. podem contribuir para o desenvolvimento sustentável da aquicultura paranaense.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho pode-se observar a importância de se realizar o monitoramento da água nos locais de cultivo de ostras, pois o conjunto dessas informações pode auxiliar tanto a comunidade local, ressaltando a qualidade das ostras cultivadas na Baía de Paranaguá, quanto os consumidores, que terão garantia de procedência desse alimento e conhecimento do seu estado sanitário referente aos vibrios, esse grupo de bactérias tão importantes para a aquicultura e para a saúde pública.

Quanto ao ganho para a pesquisa acadêmica e do conhecimento para os alunos, a condução de um trabalho técnico mostra que o planejamento, a responsabilidade e comprometimento são essenciais para se alcançar bons resultados. Não houve grande dificuldade operacional na realização das técnicas de laboratório, pois todos os integrantes do Laboratório de Sanidade Aquícola trabalharam em conjunto, com muito envolvimento, possibilitando assistência para melhor qualidade dos resultados desse trabalho.

## 8. CONCLUSÕES

As águas onde estão localizados os cultivos de ostra da Ponta Oeste da Ilha do Mel, PR, possuem *Vibrio* spp. com maior ocorrência de espécies não fermentadoras de sacarose. Porque entre espécies não fermentadoras de sacarose podem estar incluídos *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, ambos de grande relevância para saúde pública e prioritárias dentro do monitoramento de vibrionáceos, é importante que se complemente este estudo com a identificação não só do gênero, mas também das espécies de víbrios isoladas nas amostras de água. Mais estudos que cubram todas as estações do ano são necessários para melhor avaliação das condições microbiológicas dos bivalves cultivado se sua relação com as condições ambientais do litoral paranaense.

## 9. REFERÊNCIAS

ALMEIDA FILHO E. S. *Vibrio vulnificus* em pescado, uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo v. 18, n. 116, p. 23-28. Jan. 2004.

BARROS, G. C. ***Vibrio parahaemolyticus*: Isolamento e identificação em crustáceos e moluscos na Baía de Sepetiba- RJ.** 75 f. Tese de (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 1977.

BEIRAO, L.H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M. *et al.* **Processamento e industrialização de moluscos.** In: Seminário e Workshop Tecnologia para Aproveitamento Integral do Pescado, Campinas, 2000. Palestras. Campinas: ITAL, Centro de Tecnologia de Carnes, 2000. p. 38-84.

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília n.6, p.869-874, Jun. 2012.

CERICATO, L. **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](http://www.psfaquicultura.ufc.br/site/wp-content/uploads/2012/05/Palestra-no-PSF_CAMAR%C3%83O_Leonardo-Cericato_MSD.pdf). Acesso em 03 de maio de 2014.

CHALCOSKI, G. M. S. **Pesquisa de bactérias de gênero *Vibrio* em ostras cultivadas na Ponta Oeste, Ilha do Mel, Paranaguá-PR.** (Trabalho de Conclusão de Curso) – Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, 2014.

CORRÊA, A. A.; ALBARNAZ J. D.; MORESCO V., POLI C. R.; TEIXEIRA L. T.; SIMÕES D. M. O., BARARDI C. R. M. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella* enteric serovar Typhimurium. **Marine Environmental Research**.V.63. p.479-489, 2007.

- DALMASSO, A.; CIVERA, T.; BOTTERO, M.T. Multiplex primer-extension assay for identification of six pathogenic vibrios. **International Journal of Food Microbiology**.v.129, p. 21-25, 2009.
- EYLES, M. J.; DAVEY, G. R. Microbiology of the commercial depuration on the Sydney Rock Oyster *Crassostrea commercialis*. **Journal Food Protect** v.47, p.703-6, 1984.
- FERREIRA, T. M. **Quantificação de bactérias do gênero *Vibrio* em Pontal do Sul, litoral do Paraná- PR.** (Trabalho de Conclusão de Curso) –Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, 2013.
- HASEGAWA L. M. B.; SOUZA C. P., ALMEIDA B. C.; ROSERO E. M. B., LOPES R.; RIVERA I. N.G. Comunicações sobre Ocorrência de Espécies Exóticas Invasoras. ***Vibrio cholerae*: Microrganismo exótico no Brasil?**. São Paulo- SP 2003. Disponível em:  
[http://www.mma.gov.br/estruturas/174/arquivos/174\\_05122008111611.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/174/arquivos/174_05122008111611.pdf)  
Acesso em 07 de maio de 2014.
- JONHSON H. C.; LINSTON J. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to cold oysters, fish fillets and crabmeat. **Journal of Food Science**. California, v.38, p 437- 444, jan. 1973.
- LEWIS M. R. **Evaluation of a Flow- Through Depuration System to Eliminate the Human Pathogen *Vibrio vulnificus* from the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*).** (Degree of Master of Science)- Auburn University, Alabama, 2010.
- LIMA, A. S. ***Vibrio* em camarão e na água de três fazendas de Carcinicultura no Ceará.** (Dissertação Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, 2007.
- LINKOUS D. A.; J. D. OLIVER. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus* FEMS **Microbiology Letters**.174: 201-214, 1999.
- MATTÉ R.G. **Estudo de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos por meio de métodos moleculares.** (tese de livre-docência. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP)- Universidade de São Paulo, 2003.



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.04, p. 1191-1199. Out/Dez. 2009.

MARTINS F. O. **Avaliação da qualidade higiênico- sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescados crus servidos em bufês na cidade de São Paulo.** (Dissertação Mestrado em Saúde Pública) -Universidade de São Paulo, 2006.

NUNES A. J. P.; MARTINS, P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Revista Panorama da Aquicultura** v.12, n. 72, p. 23-33, 2002.

PAIVA, C.P.; BORGES, R.G.; PANETTA, J.C. Frequência de quadros gastroentéricos em aeronautas: Pressuposta ligação com toxinfecções alimentares. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 75, p. 13- 23, fev. 2000.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrios* patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes do Rio de Janeiro: Um alerta para a Saúde Pública. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. P. 302- 303. Mai- Jun. 2007.

PIRES, C. E. T. **Principais Bactérias Presentes em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's).** (Trabalho de Conclusão de Curso) Universidade Federal do Rio Grande do Sul), 2011.

PRUZZO C.; GALLO G.; CANESI L. Persistence of *Vibrios* in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 761-772, 2005.

RAMOS, R. J. ***Vibrio* spp. em ostras e águas de áreas de cultivo de 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.

RIBEIRO, C. M. F. **Aspectos gerais da vibriose em camarão-marinho**. 2005. 40 f. Pós-Graduação (Especialização em Microbiologia) – Faculdade Frassinetti do Recife, PE, 2005.

RODASKI, E. C. **Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em águas do Complexo Estuarino de Paranaguá, Vila do Maciel, PR**. (Trabalho de Conclusão de Curso) – Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná), 2014.

SILVA, M. A. C. **Ocorrência e caracterização de *Vibrio vulnificus* isolados de amostras de moluscos e água de áreas de cultivo em Santa Catarina**. (Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade do Vale do Itajaí. 2003.

SINELL, H, J. **Introduccion a la higiene de los alimentos**. 4. Ed. Zaragoza: Acribia. P 126. 1981

SURTO DE CÓLERA. **Organização Mundial da Saúde**. Edição 2006. Página 07. Disponível em [http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO\\_CDS\\_CPE\\_ZFk\\_2004.4\\_por.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_ZFk_2004.4_por.pdf) acesso em 05 de maio de 2014.

VIEIRA, R. H. S. F.; VIEIRA, G. H. F.; MACRAE, A.; LIMA, E. A.; SOUZA, O. V.; BARROS, L. M. O. Víbrios sacarose negativos isolados de ostras *Crassostrea rhizophorae* comercializadas em barracas de praia na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. **Boletim Tecnologia Científica Cepnor**. Belém, v. 7, n. 1, p. 9 – 16. 2002.