

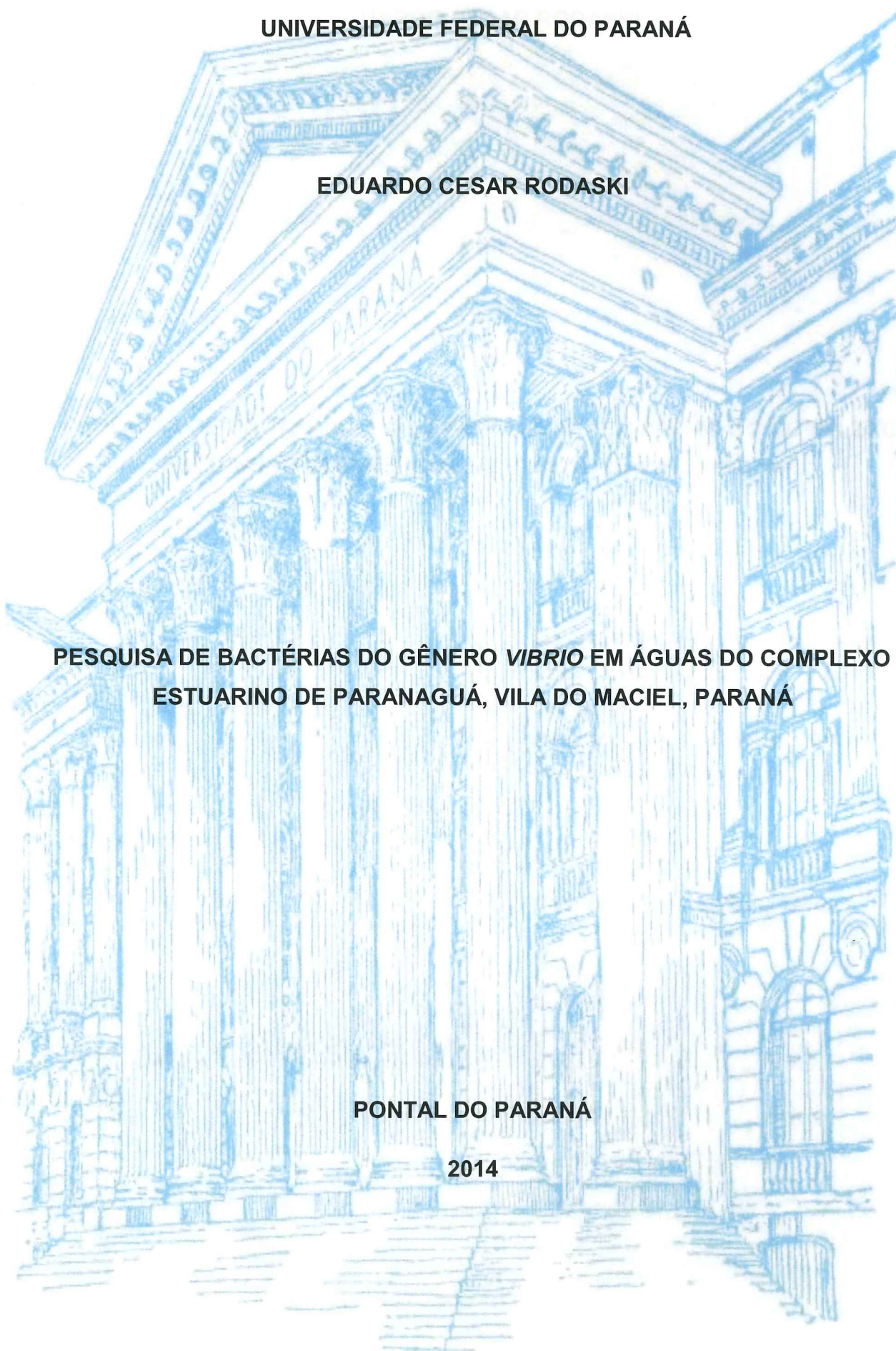
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**EDUARDO CESAR RODASKI**

**PESQUISA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO* EM ÁGUAS DO COMPLEXO  
ESTUARINO DE PARANAGUÁ, VILA DO MACIEL, PARANÁ**

**PONTAL DO PARANÁ**

**2014**



**EDUARDO CESAR RODASKI**

**PESQUISA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO* EM ÁGUAS DO COMPLEXO  
ESTUARINO DE PARANAGUÁ, VILA DO MACIEL, PARANÁ**

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: Dra. Luciene C. Lima

M  
2014-11

**PONTAL DO PARANÁ**

**2014**

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

R685p Rodaski, Eduardo Cesar  
Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em águas do complexo estuarino de Paranaguá, Vila do Maciel, Paraná. / Eduardo Cesar Rodaski. – Pontal do Paraná, 2014.  
26 f.; 29 cm.

Orientadora: Profª Drª 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. Ostreicultura. 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**


**Eduardo Cesar Rodaski**

### **PESQUISA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO VIBRIO EM ÁGUAS DO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, VILA DO MACIEL PARANÁ**

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

  
Dr. Carlos Eduardo Belz  
Membro Examinador

  
Msc. Daniele Priscila Conceição  
Membro Examinador

Pontal do Paraná, 11/06/2014.

## RESUMO

Os membros da família *Vibrionaceae* são habitantes naturais de ambientes marinhos e estuarinos, necessitando de, pelo menos, 2 % de NaCl para o seu crescimento. São várias as espécies de *Vibrio* de interesse primário para a aquicultura e para a saúde pública. Em humanos, a ocorrência de infecções severas de vibriose é fortemente associada ao consumo de moluscos bivalves sem cocção ou insuficientemente cozidos. Na baía de Paranaguá, PR, Brasil, encontra-se a Vila do Maciel, em cuja ostreicultura este trabalho, pioneiro na investigação de *Vibrios* naquela região, foi conduzido. Entre novembro de 2013 a janeiro de 2014, quinzenalmente, as amostras de água foram coletadas, das quais 0,1mL eram inoculadas, em duplicata, no meio ágar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS) e incubadas a  $33\pm 1$  °C por 24h. Após a identificação fenotípica dos isolados crescidos no TCBS, denominados colônias "suspeitas" foram feitas a sua contagem e a categorização, conforme utilização da sacarose do meio, isto é, fermentadoras (SAC+) e não fermentadoras (SAC-). Transferidos para o meio ágar soja tripticase (TSA), os isolados foram submetidos a provas de Gram, oxidase, catalase, motilidade, sulfeto e indol para triagem das colônias verdadeiramente *Vibrio*, ditas "confirmadas". Valores médios de pH, de temperatura e de salinidade da água foram 7,85, 25,5°C e 29,9, respectivamente. O maior número de suspeitas (59), ocorreu na segunda amostragem, em contraste com a primeira amostragem, em que não houve crescimento algum. Ao longo do tempo, a categoria SAC- confirmadas, apresentou diferença significativa a  $p\leq 0,05$ . Foram 12 colônias SAC+ e 20 SAC- confirmadas. A contagem total de *Vibrio* spp. por litro de água, variou de 0/L a 50.000/L, valores abaixo daqueles descritos na literatura. As águas onde estão localizados os *longlines* da Vila do Maciel, possuem os tipos SAC+ e SAC-, com maior ocorrência de espécies SAC-, onde podem se incluir *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, ambos de grande relevância para saúde pública. Este trabalho deverá ter continuidade, sobretudo com avaliações ao longo das 4 estações do ano e identificação das espécies de *Vibrio* mais frequentes na Vila do Maciel.

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

## ABSTRACT

The *Vibrionaceae* family is naturally found in marine and estuarine environments, it requires at least 2 % of NaCl to grow. From this family, some bacteria such as *Vibrio* spp. are of primary interest to both aquaculture activities and for public health matters. In humans, severe vibriosis outbreaks are related to the consumption of raw or poorly cooked sea food, especially bivalves. This work was conducted at the oyster culture of Vila do Maciel, Paranaguá bay, PR, Brazil and it is the first study on *Vibrio* bacteria done in that area. The water samples were collected from November 2013 to January 2014 at every two weeks. From the samples, 0.1 mL were inoculated in duplicate in tiosulfate citrate bile salts and sucrose medium (TCBS agar) and incubated at  $33\pm 1$  °C for 24h. All the grown colonies in TCBS, called *suspects*, were then counted and sorted according to their use of sucrose, (SAC+) or (SAC-). Transferred to triptone soy agar (TSA) and incubated at  $33\pm 3$  °C for 24h, five isolates per plate were submitted to Gram stain, oxidase, catalase, sulfur reduction, indole production e motility tests, in order to have the suspects confirmed as *Vibrio* spp. The average values measured at the sampling sites were 7.85, 25.5°C e 29.9, for pH, temperature and salinity, respectively. The higher number of suspects grown (59) occurred on the second in contrast with the absence of grows in the first sampling. From the total of 32 colonies confirmed as *Vibrio* spp., 12 were SAC+ and 20 were SAC- for which a significant difference was found, at  $p\leq 0.05$ . The quantity of *Vibrio* spp. Per volume of water ranged from 0,0/L to 50,000/L, values relatively low when compared to published papers. The waters surrounding the *longlines* of Maciel hold either type SAC+ and type SAC- *Vibrio*, although the SAC-type was found in higher number. Among those, species such as *V. Parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, both particularly relevant to public health could be present. Additional work must be done at Vila do Maciel to identify and to evaluate the frequency of the *Vibrio* species during all seasons of the year.

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



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 O GÊNERO VIBRIO E SUAS IMPLICAÇÕES	1
1.1.1 Vibriose e saúde pública	1
1.1.2 Vibriose e saúde aquícola	2
1.2 LEGISLAÇÃO	3
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	5
<b>3. OBJETIVO GERAL</b>	6
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
<b>4. ÁREA DE ESTUDO</b>	6
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	8
5.1 AMOSTRAGENS	8
5.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	8
5.2.1 Meios de cultura e Testes Presuntivos	10
5.2.1.1 Tiosulfato Citrato Sais de Bilis (TCBS)	10
5.2.1.2 Coloração de Gram	10
5.2.1.3 Oxidase	10
5.2.1.4 Catalase	11
5.2.2 Provas Bioquímicas Adicionais	11
5.2.2.1 Sulfeto, Indol , Motilidade (Meio SIM)	11
5.3 ANÁLISES DOS RESULTADOS	12
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	13
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	23
<b>8. CONCLUSÃO</b>	24
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	25

## 1. INTRODUÇÃO

Os membros da família *Vibrionaceae* são habitantes naturais de ambientes marinhos e estuários, e que possuem a necessidade de cloreto de sódio (pelo menos 2 a 3%) para o seu crescimento. Colonizam algas, copépodes, plânctons e outras plantas aquáticas onde formam um biofilme para ajudar na sua sobrevivência (TORTORA *et al.*, 2012). Essas bactérias são Gram negativas, tem a forma de bastonetes curtos e curvados e são móveis devido a presença de um flagelo polar.

Diversas espécies do gênero *Vibrio* são de interesse tanto para a aquicultura quanto diretamente para o homem (FERREIRA, 2013). Estão incluídas no gênero *Vibrio* 12 espécies com grande potencial patogênico. Destas, as espécies de interesse primário para a saúde pública são *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*.

### 1.1.O GÊNERO *VIBRIO* E SUAS IMPLICAÇÕES PARA HUMANOS E PARA A AQUICULTURA

#### 1.1.1 Vibriose e saúde pública

Em humanos, a ocorrência de vibrioses severas é fortemente associada ao consumo de moluscos bivalves sem cocção ou insuficientemente cozidos. Em casos de surtos, medidas efetivas contra a proliferação da doença são o fornecimento de água potável e melhoria das condições higiênico-sanitárias gerais. O *Vibrio cholerae* é o agente causador da cólera, uma grave vibriose gastrointestinal. Um surto de cólera ocorreu no município de Paranaguá, PR, em abril de 1999, com 467 casos notificados e 3 óbitos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004). Na cólera, a desidratação é rápida, o sangue se torna viscoso, impossibilitando o funcionamento dos órgãos vitais.

O *V. Parahaemolyticus*, outro agente de vibrioses graves, encontra se amplamente distribuído no ambiente marinho, sendo, também, um dos mais



frequentes em infecções relacionadas ao consumo de pescado cru ou sem cocção suficiente (PEREIRA *et al.*, 2007). No caso do *V. vulnificus*, as infecções são causadas a partir de lesões na pele, expostas a água salgada; A disseminação rápida do *V. vulnificus*, atuando na destruição de tecidos infectados, pode até exigir a amputação do membro afetado. Estão em alto risco pessoas com o sistema imune comprometido ou que sofrem de doenças hepáticas (FERREIRA, 2013).

Uma ostra pode filtrar até 10 L de água por hora e até 200 L por dia, por isso são conhecidas como reservatório de vários micro-organismos patogênicos como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e microrganismos de origem fecal, principalmente espécies de *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli*. Ostras e mexilhões contaminados por patógenos humanos não apresentam nenhum sinal externo de contaminação, como mudança no sabor ou cor ou até mesmo odor ruim. No entanto, ao serem ingeridos mal cozidos ou crus funcionam como veículo de transmissão, podendo provocar enfermidades fatais ao consumidor (RODRIGUES, 2009).

### 1.1.2 Vibriose e saúde aquícola

Mundialmente as doenças bacterianas mais comuns em aquicultura devem-se a espécies de *Aeromonas*, *Streptococcus* spp. e *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. harveyi*, por exemplo). Dentre os fatores que influenciam o desenvolvimento microbiológico em sistemas de aquicultura, encontram-se os parâmetros de qualidade da água (como salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido), quantidade e qualidade da alimentação, além de práticas de manejo como ciclos de cultivo contínuos e deficiência na limpeza e desinfecção dos tanques. Adoção de medidas biosseguras no cultivo, o uso de imuno estimulantes e de probióticos via ração e, ainda, boas praticas de manejo, são boas maneiras de evitar o estresse, que enfraquece a imunidade dos organismos cultivados aumentando, assim, sua susceptibilidade a doenças.

Como ocorre em peixes, as doenças que afetam crustáceos resultam do desequilíbrio entre o organismo, o ambiente e o patógeno. Quando ocorrem mudanças bruscas no meio ambiente, o sistema de defesa dos crustáceos torna-se debilitado, devido ao gasto energético extra empregado na adaptação fisiológica às novas condições estressantes; Dessa forma, eles se tornam sensivelmente vulneráveis ao ataque dos patógenos presentes no meio (LIMA, 2007). Em sistemas de carcinicultura, as espécies *V. alginolyticus*, *V. harveyei*, são particularmente impactantes.

Já mencionado, a manifestação das vibrioses pode estar associada a outros fatores, tais como feridas e imunossupressão e sua detecção é relativamente fácil; Difícil é, todavia, determinar a sua significância no problema de saúde. Por exemplo, em alguns casos, os víbrios podem não ser a causa primária da mortalidade do camarão, agindo oportunisticamente. Em todo caso, o gênero *Vibrio* representa grandes perdas econômicas para a indústria aquícola, especialmente na produção de crustáceos (BESERRA DA SILVA *et al.*, 2012), podendo provocar, em carcinoculturas, mortalidade de até 100% nas 24 horas do aparecimento da infecção (COSTA, 2006).

## 1.2 Legislação Brasileira

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil é quem regulamenta a qualidade bacteriológica de pratos para consumo a base de pescados. Ainda não há uma legislação vigente que estabeleça um padrão legal sobre víbrios presentes na água. Recentemente o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) publicou a Instrução Normativa IN nº 7 de 08/05/12, que trata do Programa Nacional de Controle Higiênico-sanitário de Moluscos Bivalves, PNCMB. Com esse programa as responsabilidades foram divididas entre o MPA, responsável pelo monitoramento de microrganismos e biotoxinas marinhas e entre o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual ficou responsável em fiscalizar e inspecionar indústrias processadoras de moluscos

bivalves certificadas pelo MPA. Até o momento, o único grupo de bactérias monitoradas por esse programa são coliformes. (MPA, 2014).

## 2. JUSTIFICATIVA

O gênero *Vibrio* é de extrema importância para a saúde humana e para a aquicultura; Não somente cuidados no processamento do pescado, mas também com a água do mar onde são cultivados os bivalves, podem influenciar a presença e ação de bactérias *Vibrio*. No Complexo Estuarino de Paranaguá, PR (lat.25°16'34"S; long. 48°17'42"W), situa-se a Vila do Maciel, uma comunidade cuja fonte principal de renda tem sido a pesca extrativa, embora os estoques naturais estejam decaindo significativamente nos últimos anos (Pescadores, comunicação pessoal, 2014). Uma alternativa para gerar renda sem perder o vínculo com a obtenção de pescado e com a atividade marinha da comunidade, vem sendo a instalação de ostreiculturas nas águas à frente da Vila. A iniciativa, que teve na época de sua implantação, a coordenação e apoio de uma instituição extensionista pública, segue com as tentativas de produção de ostras e mais recentemente de mexilhões.

Até o momento, a falta de literatura a respeito, indica que nenhum estudo sobre bactérias do gênero *Vibrio* foi feito na Vila do Maciel, uma razão a mais para que o monitoramento sanitário deste local seja considerado uma prioridade, não só para contemplar estudos acadêmicos, mas também porque o desenvolvimento adequado da produção de moluscos naquela área pode representar um grande impulso para a maricultura paranaense; Analisar as água de cultivo para gerar informações e medidas de prevenção contra doenças infecciosas é, portanto, um trabalho importante.

### 3. OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de *Vibrio* spp na área do cultivo de bivalves da Vila do Maciel, Complexo Estuarino de Paranaguá, PR.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Isolar bactérias do gênero *Vibrio* da água onde está situado do cultivo de bivalves da Vila do Maciel;
- Classificar e quantificar colônias de *Vibrio* isoladas, conforme sua utilização de sacarose do meio de cultura Tiosulfato Citrato Sais de Bile;
- Correlacionar a quantidade isolada de *Vibrio* com parâmetros físico-químicos da água do cultivo de bivalves da Vila do Maciel .

### 4. ÁREA DE ESTUDO

O local escolhido para as amostragens é a Vila do Maciel, no Complexo Estuarino de Paranaguá, PR, próxima de 25°33'41"S e 48°25'20"W, onde está a Gamboa do Maciel (Figura 1). A escolha foi devido à condição sócio-econômica e cultural da Vila e de sua localização estratégica dentro da Baía de Paranaguá, o que a torna relativamente muito frequentada, não só por moradores, mas também por turistas que compram ali pescado e mariscos.

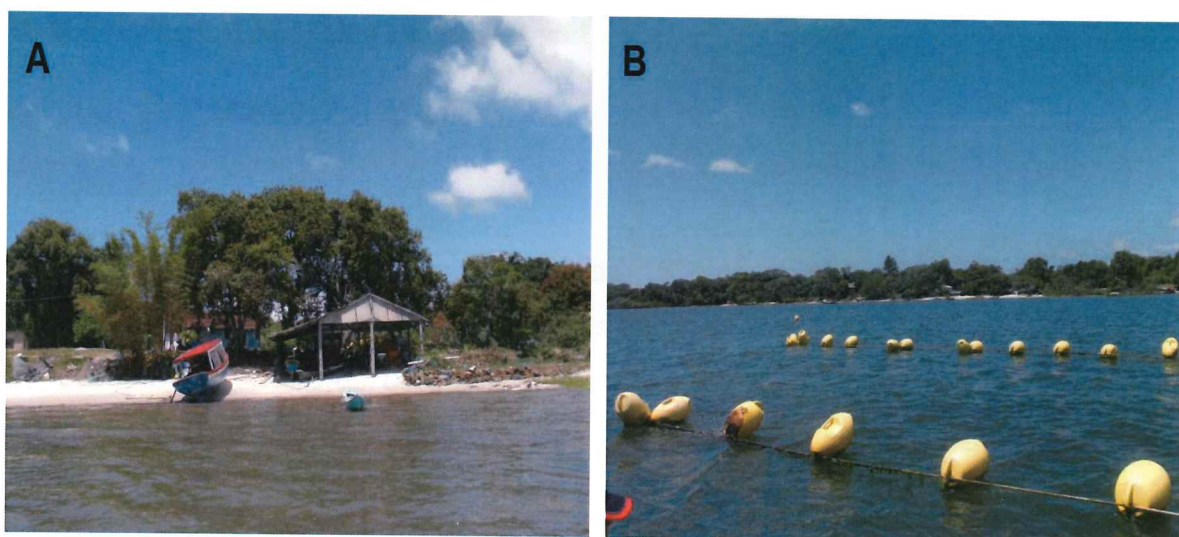


Figura 1- Imagem da Gamboa do Maciel (A) Vista panorâmica dos "longlines" dos quais foram realizadas as amostragens (B).

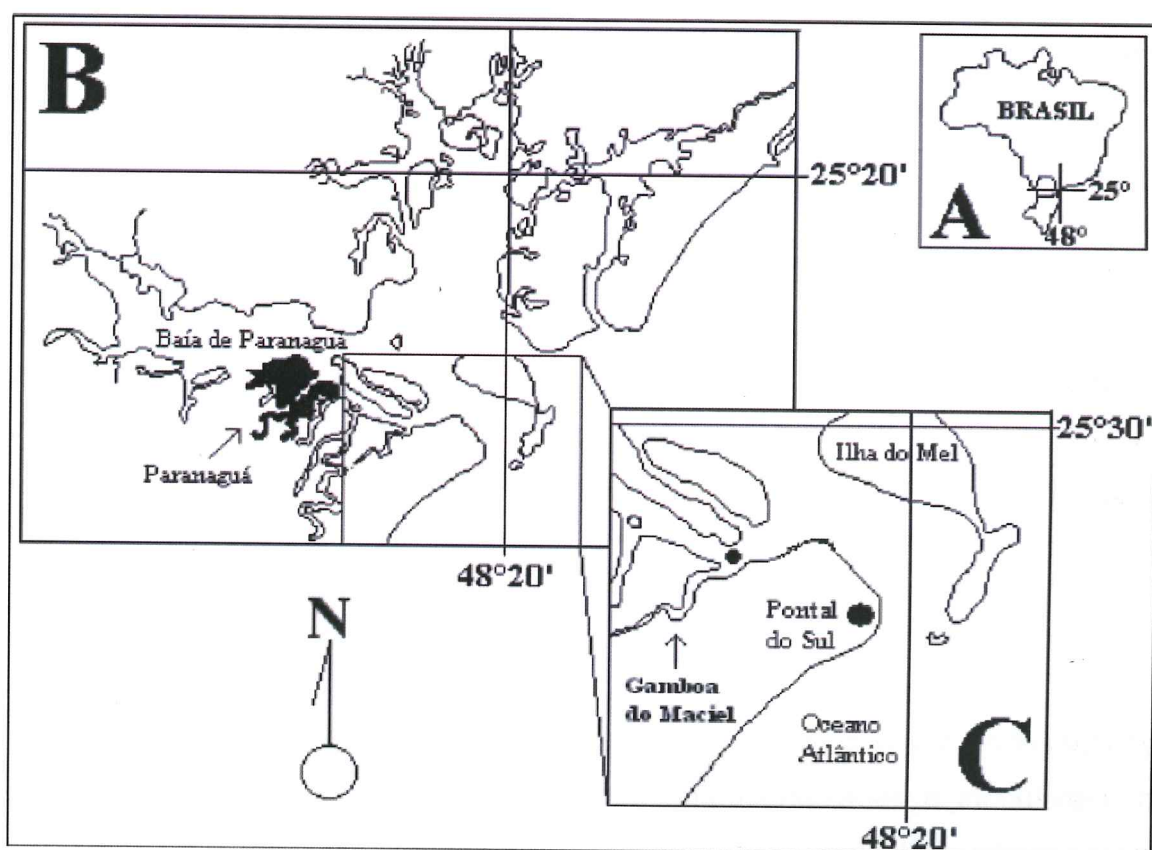


Figura 2 – Mapa do Brasil (A); Detalhamento do Complexo Estuarino de Paranaguá (B); Região estudada, marcada com o círculo escuro menor (C).



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

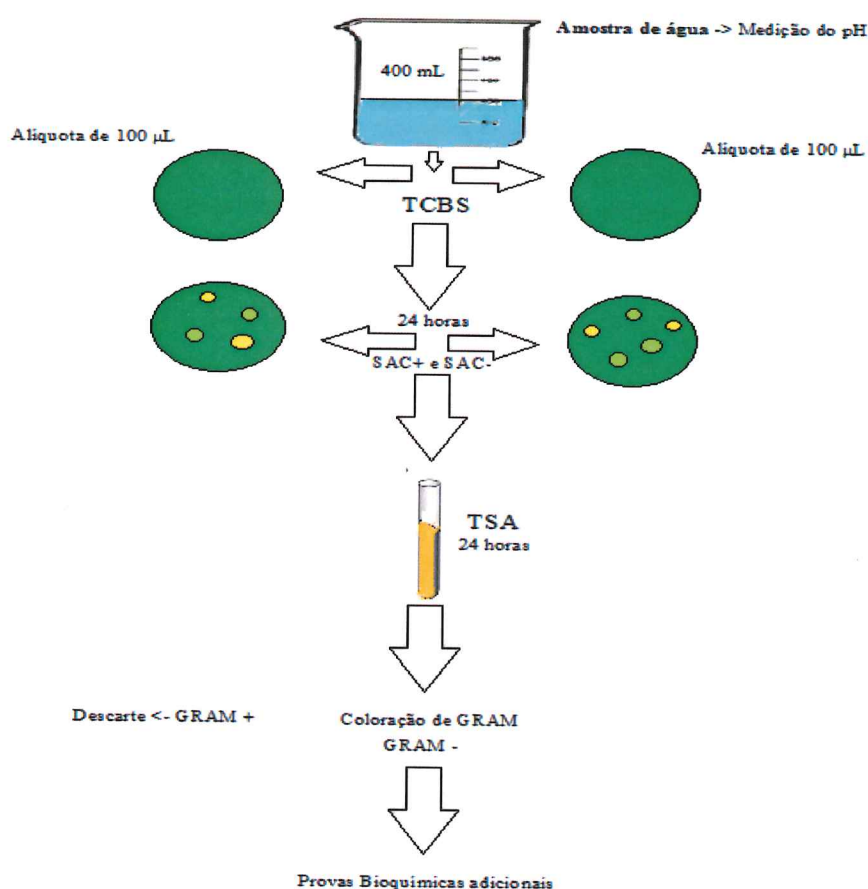
### 5.1 AMOSTRAGENS DE ÁGUA

As amostragens ocorreram a cada 15 dias, num total de 6 amostras ao longo do cultivos (*longlines*). As amostras de água foram obtidas em duplicata, de 2 pontos separados das cordas e bóias de suporte, previamente demarcados e identificados com fita de nylon colorida. No ponto 1 (P1) a profundidade era de 7,9 m e no ponto 2 (P2) de 8,0 m. A coleta de água foi padronizada em 1 m abaixo da superfície. As coletas foram feitas no período de primavera-verão, entre 2013 e 2014 (de 05/11/13 a 21/01/14). O início das coletas de água propriamente, junto aos *longlines*, começaram próximo das 10h da manhã, perfazendo cerca de 40 minutos até o final. Com uma prancheta e planilha, foram registrados o clima do dia e do dia anterior, a condição da maré, bem como outros acontecimentos de interesse para o trabalho; 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 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). Na chegada imediatamente foi medido o pH, com medidor digital portátil (*PHTeck*, pH100).

### 5.2. PROCEDIMENTO LABORATORIAL

Na capela de fluxo laminar, previamente esterilizada com luz ultravioleta por 20-30 minutos, as amostras de água foram homogeneizadas e inoculadas, na quantidade de 0,1 mL, em placas de Petri contendo ágar tiosulfato citrato sais de bile (TCBS), e incubadas em estufa bacteriológica a 33°C por 24 horas, para posterior leitura, classificação e contagem das colônias. Tais colônias foram classificadas conforme utilização da sacarose do meio, ou seja, colônias amarelas

são sacarose positivas (SAC<sup>+</sup>) e colônias verdes são sacarose negativas (SAC<sup>-</sup>). Em seguida, (se houvesse 5 ou mais colônias crescidas), eram transferidas 5 colônias do meio TCSB para o meio Agar Soja Triptona (TSA), e mantidas em estufa a 33°C por 24 horas, para realização dos testes de coloração de Gram, de oxidase, de catalase e das provas bioquímicas adicionais no meio sulfeto/indol/motilidade (Figura 2). Os meios para realização das provas bioquímicas foram preparados no Lab. de Sanidade Aquícola, na véspera da sua utilização e mantidos refrigerados a 8°C.



**Figura 3-** Fluxograma resumido do processamento das amostras de água oriundas do cultivo de bivalves da Vila do Maciel, PR, para isolamento de *Vibrio* spp.

## 5.2.1 Meios de cultura e Testes Presuntivos

### 5.2.1.1 Tioossulfato Citrato Sais de Bile (TCBS)

No ágar TCBS, o extrato de leveduras e a peptona fornecem nitrogênio e vitaminas. O tioossulfato de sódio, citrato de sódio, colato e bÍlis de bovino são agentes seletivos que fornecem um pH alcalino para suprimir coliformes e inibir organismos Gram-positivos. O *Vibrio cholerae* é sensÍvel a ambientes ácidos, por isso o pH do meio é aumentado para potenciar seu desenvolvimento. A concentração de sódio elevada favorece *Vibrio cholerae* e outras espécies de víbrio são, que na sua maioria, halófilas. As colônias crescidas em TCBS são classificadas em negativas ou positivas conforme a utilização de sacarose do meio; Colônias esverdeadas, não fermentadoras do açúcar, são sacarose negativa, enquanto as colônias amarelas, fermentadoras de açúcar, são sacarose positiva.

### 5.2.1.2 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi feita usando químicos do Laboratório *Laborclin* (Pinhais, PR), em bactérias puras e recém-crescidas (24h) em meio TSA com 3% de NAC. 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 roxo azuladas são Gram positivas, e colônias avermelhadas são Gram negativas, onde se enquadram os *Vibrio* spp.

### 5.2.1.3 Oxidase

A enzima citocromo oxidase é um complemento protéico transmembranar relacionada à cadeia respiratória de alguns micro-organismos. 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; 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. Para o teste coloca-se uma porção do cultivo bacteriano sobre uma lâmina de vidro limpa, e adiciona-se uma gota de  $H_2O_2$  10% (ADV Farma, SP). Após aproximadamente 40 segundos, a formação de bolhas na amostra é considerada 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 Sulfeto, Indol e Motilidade (SIM)

Do crescimento do TSA a 3% de NaCl, uma pequena porção das bactérias foi transferida ao ágar SIM a 2% de NaCl. As bactérias foram inoculadas através de uma picada com agulha metálica, no centro dos tubos contendo o meio de cultura, seguido de incubação por 24 horas a 33°C. Os resultados para a prova de motilidade indicaram positivo quando houve crescimento difuso e evidenciado, a partir da linha da picada; Quando a bactéria cresceu somente na linha da picada, a motilidade foi negativa. Para a prova de indol, após adicionar 3-4 gotas do reativo de Kovac's na superfície do meio, se houve o surgimento de um anel com coloração vermelha, a bactéria possui triptofanase, portanto, reação positiva. Um anel que permaneceu da cor do reagente indicou indol negativo. Quanto ao

sulfeto, foram considerados positivos os isolados que desenvolveram coloração negra no meio de cultura.

### 5.3 ANÁLISES DOS RESULTADOS

Os resultados foram tabulados no programa *Excel* (Microsoft Windows), com comparação de médias pelo teste T e nível de significância a  $p \leq 0,05$ . A distribuição de frequência dos isolados, bem como a análise entre a quantidade e tipo de *Vibrio*, ao longo do tempo de amostragem, foram conduzidos.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos parâmetros físico-químicos medidos na água do cultivo de bivalves da Vila do Maciel estão na tabela 1.

**Tabela 1-** Amplitude, média e desvio-padrão (dp) dos parâmetros físico-químicos da água do cultivo de bivalves da Vila do Maciel, PR, entre novembro de 2013 e janeiro de 2014

Parâmetros físico-químicos	Ponto de amostragem (média de P1 e P2)	
	Amplitude	Média $\pm$ dp
pH	7,70 - 7,95	7,85 $\pm$ 0,09
Temperatura ( $^{\circ}$ C )	23,25 - 28,5	25,5 $\pm$ 1,77
Salinidade	24 - 27	25,5 $\pm$ 1,06

O pH da água variou discretamente , ou seja, apenas 0,25 décimos. À primeira vista, a maior variação parece ter ocorrido com a temperatura, em que houve variação de aproximadamente  $5^{\circ}$ C, seguida da salinidade, com 3 de variação. Estatisticamente, porém, não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) para nenhuma das três variáveis físico-químicas ao longo do tempo.

Quase todas as amostragens aconteceram em dias de sol, e houve chuva na véspera. O dia anterior à primeira amostragem foi particularmente de muita chuva, porém, durante o trabalho esteve ensolarado, com a maré vazante e presença de vento forte. Na segunda amostragem, o dia esteve ensolarado com a maré vazante, e sem vento. Na terceira amostragem havia sol e calor intensos,

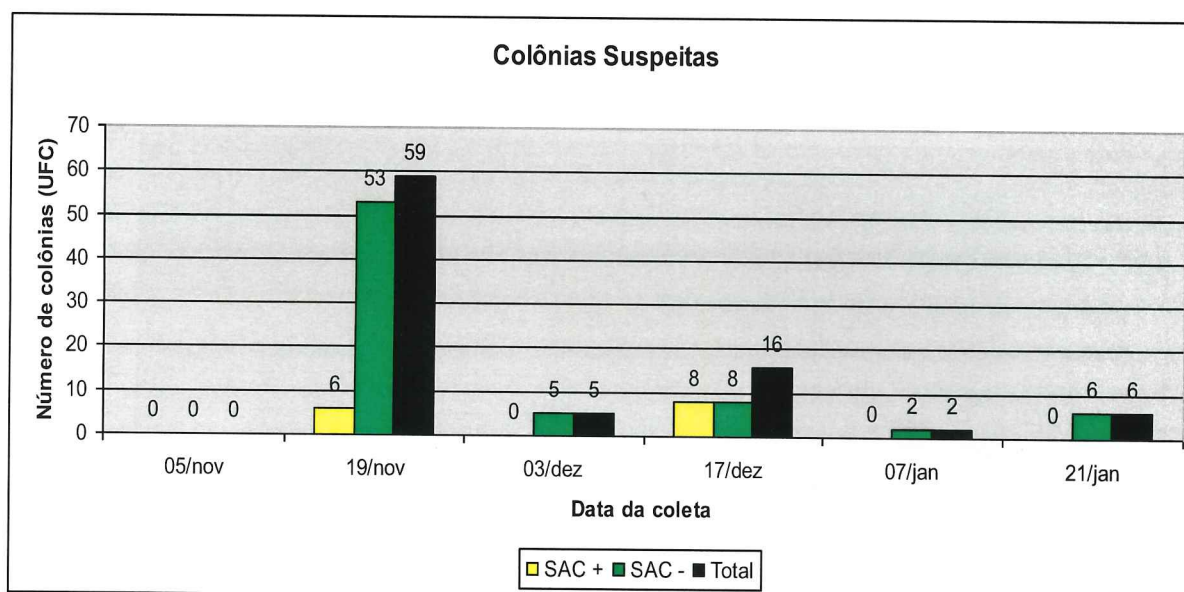


com a maré enchendo e sem ventos. Na quarta amostragem havia sol e calor, com a maré vazante e vento. Na quinta amostragem o dia estava nublado, maré vazante sem ventos. Na sexta amostragem havia sol e calor com maré vazante e com a presença de vento (Figura 4).

	Véspera		Dia de coleta de água					
	sol	chuva	sol	nublado	chuva	Maré		vento
Amostragem								
A1	+	+++	+			+		+
A2		+	+			+		++
A3		+	+++				+	
A4		+	++			+		+
A5		+		++		+		+
A6			++			+		+

**Figura 4-** Diagrama resumo sobre as condições climáticas na véspera e no dia das amostragens de água do cultivo de bivalves da Vila do Maciel, PR. (+ Fraco ++ Forte +++ Intenso).

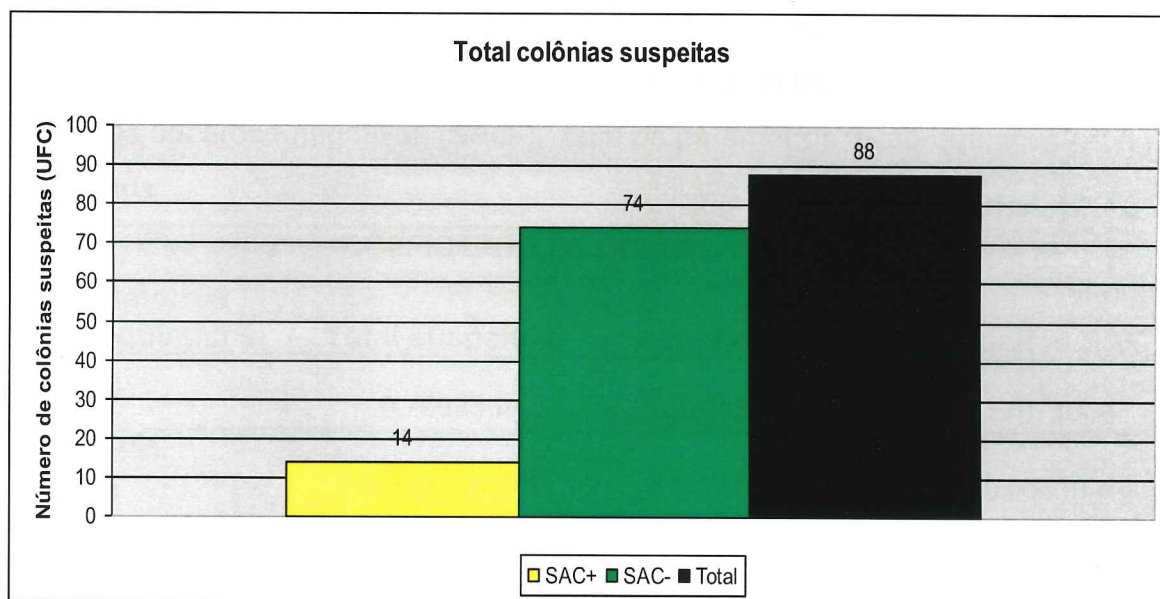
Os resultados sobre a quantidade de “colônias suspeitas” estão na figura 5. Colônias suspeitas são todos aqueles isolados oriundos das amostras de água, crescidos nas placas contendo meio TCBS, incubadas por 24h de a 33°C.



**Figura 5-** Colônias suspeitas sacarose positivas (SAC+), suspeitas sacarose negativas (SAC-) e total de colônias suspeitas isoladas na água de cultivo de bivalves, na Vila do Maciel, Paranaguá, PR

Em números absolutos, observa-se que na segunda amostragem foi onde ocorreu o maior número de colônias suspeitas (59), em contraste com a primeira amostragem, em que não houve crescimento algum. Espécies não fermentadoras de sacarose (SAC<sup>-</sup>) foram maioria dentre os isolados suspeitos. Na 4<sup>a</sup> amostragem o número absoluto de colônias SAC<sup>+</sup> foi igual ao de SAC<sup>-</sup> ou seja, 8 colônias.

Na 1<sup>a</sup> amostragem não houve crescimento de colônias no TCBS, não se sabe se foi exatamente pela ausência de *Vibrio* naquelas amostras de água ou se foi por alguma falha no preparo ou até mesmo na conservação do meio TCBS; Também há a hipótese de a água ter sido coletada muito na superfície contrariando a recomendação de 1 m como padrão.



**Figura 6-** Total de colônias suspeitas sacarose positiva (SAC+), de colônias sacarose negativas (SAC<sup>-</sup>) e total de colônias suspeitas (somatório de SAC+ e SAC<sup>-</sup>) em amostras de água da ostreicultura da Vila do Maciel, PR.

Buscando possível influência dos parâmetros ambientais na quantidade e tipo de colônias de *Vibrio* isoladas, foi feito o teste de correlação das 3 categorias (SAC<sup>+</sup>, SAC<sup>-</sup> e colônias totais), com o pH, com a salinidade e com a temperatura (Tabela 2).

**Tabela 2-** Correlação entre as médias de colônias suspeitas, entre médias das colônias suspeitas sacarose positivas (SAC+) e entre a média das colônias suspeitas sacarose negativas (SAC-), com os parâmetros físico-químicos da água amostrada.

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)			
Parâmetros físico-químicos	Total suspeitos	Suspeitos SAC+	Suspeitos SAC <sup>-</sup>
pH	- 0.7668363	- 0.3663366	- 0.7871036
	P= 0.07521 <b>NS</b>	P= 0.4751 <b>NS</b>	P= 0.06316 <b>NS</b>
Temperatura (°C)	0.1321894	-0.1711675	0.1784071
	P= 0.8029 <b>NS</b>	P= 0.7458 <b>NS</b>	P= 0.7352 <b>NS</b>
Salinidade	- 0.3647062	- 0.5015694	- 0.3146602
	P= 0.4772 <b>NS</b>	P= 0.3107 <b>NS</b>	P= 0.5436 <b>NS</b>

Aplicado o teste t (*Student*) a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ) (S= significativo, NS= não significativo)

Na tabela 2 pode-se ver que o total de suspeitos não apresentou correlação significativa (NS) com a salinidade, temperatura e o pH.

No caso das colônias SAC<sup>+</sup>, não houve correlação significativa com pH, salinidade e temperatura. Quanto às colônias SAC<sup>-</sup>, não houve correlação significativa com salinidade, pH e a temperatura.

Apesar desses resultados a questão do "n" ser muito baixo pode ser o fator para que os valores não sejam significativos estatisticamente.

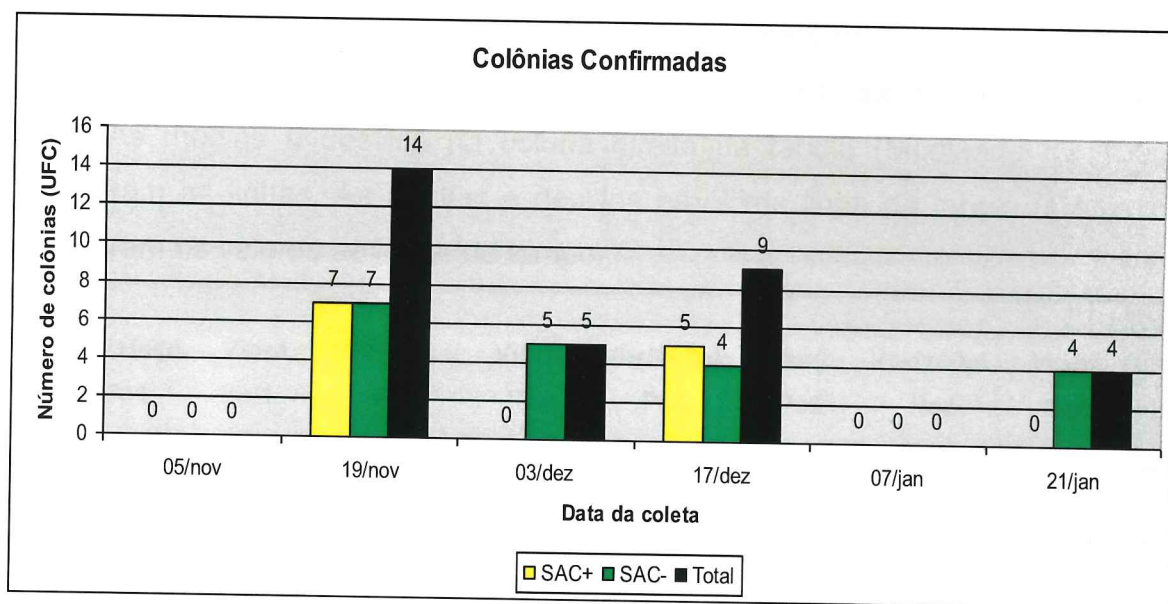
O meio de cultura TCBS é utilizado para cultivo de vibriónáceos, porém, apesar de sua boa seletividade, pode ocorrer o crescimento de outras bactérias oportunistas, como espécies *Aeromonas hydrophila*, e *Plesiomonas shigelloides* que podem se assemelhar fenotipicamente ao *V. parahaemolyticus*. O gênero

*Proteus* é outro "invasor" que pode aparecer crescido nas placas de TCBS. O teste do sulfeto é particularmente importante na separação entre *Proteus* spp e *Vibrio* spp., uma vez que estas últimas são sulfeto negativas. Nas amostras de água da Vila do Maciel foi detectada a presença de 2 bactérias sulfeto positivas, portanto, fora da contagem de *Vibrio* spp. confirmados.

Para evitar equívocos no isolamento e classificação de bactérias verdadeiramente *Vibrio* spp. as provas bioquímicas adicionais são essenciais para a confirmação do gênero. Por isso, os testes adicionais de oxidase, catalase, sulfeto, indol e motilidade são conduzidos com todas as amostras, depois de passarem pela triagem de coloração de Gram. Separar em Gram positivas ( $G^+$ ) e Gram negativas ( $G^-$ ), é o primeiro grande passo para identificação de bactérias. As colônias suspeitas que não foram claramente classificadas como Gram negativas foram descartadas e não seguiram para os testes bioquímicos; Nenhuma bactéria Gram positiva foi detectada neste estudo, mas algumas Gram negativas em formas de cocos apareceram e também foram descartadas. Outras colônias não passaram pelas provas bioquímicas adicionais, principalmente por não apresentarem respostas características nos testes de Indol e Motilidade. Víbrios possuem flagelo, assim têm motilidade positiva. O resultado positivo é quando há crescimento difuso a partir da linha da picada, o que é evidenciado pela turvação ou "névoa" do meio; Quando a bactéria cresceu somente na linha da picada, a motilidade foi considerada negativa e, portanto, a amostra foi descartada. Para a prova de indol, o surgimento de um anel avermelhado na superfície do meio indica que a bactéria possui triptofanase, portanto, quebra o aminoácido triptofano e libera indol, sendo positivo. Um anel que permanece da cor do reagente (amarelado) indicou indol negativo.

Depois de todas as provas conduzidas, fez-se a tabulação dos *Vibrio* spp. Confirmados. Os resultados estão na figura 7 a seguir.





**Figura 7-** Colônias confirmadas sacarose positiva (SAC<sup>+</sup>), confirmados sacarose negativa (SAC<sup>-</sup>) e total de colônias confirmadas (somatório de SAC<sup>+</sup> e SAC<sup>-</sup>).

Somente na 2<sup>a</sup> e na 4<sup>a</sup> amostragem foram confirmadas tanto colônias SAC<sup>+</sup> quanto colônias SAC<sup>-</sup>. Na 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> amostragens foram confirmados apenas colônias SAC<sup>-</sup>, enquanto na 1<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> amostragens não houve nenhum *Vibrio* spp. confirmado. Na 2<sup>a</sup> amostragem é onde foi registrado, em números absolutos, o maior número de *Vibrios* confirmados, sendo eles 7 SAC<sup>+</sup> e 7 SAC<sup>-</sup>, perfazendo o total de 14 *Vibrio* spp. A 4<sup>a</sup> amostragem registrou o segundo maior número total de confirmados (9). As categorias “colônias confirmadas SAC<sup>+</sup>” e “total de colônias confirmadas” não apresentaram diferença significativa ao longo do tempo; Já a categoria “colônias confirmadas SAC<sup>-</sup>” apresentaram diferença significativa (P = 0,03).



**Tabela 3-** Quantidade de *Vibrio* spp. por 100 microlitros de água (Vbr/100 $\mu$ L) , de *Vibrio* spp. por litro de água (Vibr/L), separados por placas de repetição (Pc1 a Pc4). As médias e desvios na coluna direita da tabela (Média $\pm$ dp de 100 $\mu$ L) comparam as linhas. As médias e desvios na última linha da tabela (Média $\pm$ dp) comparam os valores ao longo do tempo.

Amostra- gens	Vbr/100 $\mu$ L Pc1	Vibr/L Pc1	Vbr/100 $\mu$ L Pc2	Vibr/L Pc2	Vbr/100 $\mu$ L Pc3	Vibr/L Pc3	Vbr/100 $\mu$ L Pc4	Vibr/L Pc4	Média $\pm$ dp de 100 $\mu$ L
A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 $\pm$ 0
A2	3	30x10 <sup>3</sup>	4	40x10 <sup>3</sup>	5	50x10 <sup>3</sup>	2	20x10 <sup>3</sup>	3.5 $\pm$ 1.29 (P = 0.01)
A3	2	20x10 <sup>3</sup>	1	10x10 <sup>3</sup>	0	0	2	20x10 <sup>3</sup>	1.2 $\pm$ 0.95 (P = 0.07)
A4	2	20x10 <sup>3</sup>	3	30x10 <sup>3</sup>	2	20x10 <sup>3</sup>	2	20x10 <sup>3</sup>	2.2 $\pm$ 0.5 (P = 0.00)
A5	0	0	0	0	0	0	0	0	0 $\pm$ 0
A6	3	30x10 <sup>3</sup>	0	0	0	0	1	10x10 <sup>3</sup>	1 $\pm$ 1.41 (P = 0.25)
<b>Média <math>\pm</math> dp</b>	1.6 $\pm$ 1.33 (P = 0.03)		1.3 $\pm$ 1.75 (P = 0.12)		1.1 $\pm$ 2.04 (P = 0.22)		1.1 $\pm$ 0.98 (P = 0.03)		

A contagem total de *Vibrio* spp. variou de 0/L a 50.000/L; Das 6 amostragens, apenas a primeira não teve a presença de *vibrio* algum por litro. As espécies com maior frequência, em termos de quantidade, foram aquelas não fermentadoras de sacarose (SAC<sup>-</sup>)

Há um estudo recente sobre bactérias do gênero *Vibrio* spp. em águas no litoral paranaense, o qual foi realizado por Ferreira (2013). A presença de

bactérias em água de 5 pontos distintos no balneário Pontal do Sul, distante aproximadamente, 12 Km da Vila do Maciel, foi registrada. No estudo, Ferreira registrou a presença de vibriões em todos os pontos de amostragem, mas nas águas do Canal do DNOS (estuário, localização  $-25^{\circ} 33' 57.05''$ ,  $-48^{\circ} 21' 19.30''$ ) houve maior quantidade de *Vibrio* spp., local com maior influência de marés, dentre os pontos analisados. De todas as amostragens realizadas nos 5 pontos, a maior incidência foi de espécies SAC<sup>+</sup>, onde se enquadram, por exemplo, espécies de *V. Cholerae*. Embora não tenha quantificado bactérias por litro de água, pode se dizer que o número de colônias, em números absolutos, foi bem mais elevado neste estudo de Ferreira do que o de colônias do cultivo da Vila do Maciel.

Chalcoski (2014), pesquisou a presença de *Vibrio* spp. em águas de cultivo ostras na Baía de Paranaguá, mais especificamente em uma ostreicultura na Ponta Oeste, Ilha do Mel. A água do estudo de Chalcoski foi coletada na mesma época da amostragem de água da pesquisa feita na Vila do Maciel. O trabalho resultou na presença de *Vibrio* spp. em 50% das amostragens, com maior incidência de espécies suspeitas SAC<sup>+</sup>, porém nas colônias confirmadas houve maior incidência de SAC<sup>-</sup>. A quantidade de *Vibrio* variou de 0 a  $60 \times 10^3$ /L de água, porém, comparando a quantidade de *Vibrio*/L ao longo do tempo, no trabalho de Chalcoski, a Vila do Maciel apresentou maior número de *Vibrio*/L de água.

O monitoramento da quantidade e de tipos de *Vibrios* na água de cultivo é importante para a avaliação de locais apropriados para a instalação e/ou manejo de cultivos aquícolas (VIEIRA *et al.*, 2010). Costa (2006) isolou *Vibrio* spp. em uma fazenda de camarão marinho *L. vannamei*, localizada em um estuário, no Ceará. A pesquisadora obteve, da água de captação, em número mais provável (NMP) uma variação de  $403 \times 10^3$  a  $110 \times 10^8$  *Vibrios* /100 mL. A água do viveiro, por sua vez, apresentou uma variação de  $110 \times 10^5$  a  $110 \times 10^{12}$  *Vibrios* /100 mL. Comparado à Vila do Maciel, Costa registrou uma população de *Vibrios*/mL de água bem maior em números absolutos.

Entre os anos de 2005 e 2006, Mendes (2011), quantificou *Vibrio* spp. em água de viveiro de camarões *Litopenaeus vannamei*, cultivados em 2 fazendas no Estado de Pernambuco, nos períodos de estio e no chuvoso, Na fazenda "A" ,no estio, o número de víbrios por mL variou de  $2,4 \times 10^4$  a  $4,6 \times 10^4$ , enquanto no período chuvoso, variou de  $5,4 \times 10^4$  a  $5,7 \times 10^4$  colônias de *Vibrios* por mL. Na fazenda "B" época de estio, o número de *Vibrios* por mL variou de  $6,0 \times 10^4$  a  $2,2 \times 10^3$  , ao passo que, no período chuvoso, variou de  $3,4 \times 10^4$  a  $1,3 \times 10^3$  . Novamente, a quantidade de colônias da Vila do Maciel, em números absolutos, foi inferior às quantidades nos viveiros de camarões estudados por Mendes.

Vieira (2007) quantificou *Vibrio* spp. na água do estuário do Rio Jaguaribe, CE. A contagem de *Vibrios* por 100mL de água foi de 6.450 a mais de  $160 \times 10^4$ , quantidade esta superior aos resultados da Vila do Maciel. Vieira afirma que a análise estatística revelou concentrações significativamente maiores de *Vibrio* e Coliformes nas ostras do que na água, confirmando o potencial bioacumulador destes bivalves.

A identificação prévia de microrganismos é sempre uma arma na prevenção e na lida com patologia de organismos aquáticos. Também funciona como vigilância sanitária a fim de se oferecer produtos microbiologicamente seguros ao consumidor.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi realizado com o objetivo de começar a se conhecer o estado sanitário da água onde foi implantado os *longlines* na Vila do Maciel para avaliação da qualidade das ostras ou mexilhões ali cultivados, muito importante para aquicultura e saúde pública.

Seria de grande importância a criação e implementação de uma legislação adequada, que regulamentasse a concentração de bactérias de espécies do gênero *Vibrio*, tanto em águas quanto em moluscos bivalves.

Com o planejamento e definição das metas a serem alcançadas nesse estudo, somado ao valioso auxílio dos integrantes do Laboratório de Sanidade Aquícola, os resultados foram satisfatórios e poderão ser usados tanto por alunos do curso de Aquicultura quanto por outros interessados na área, incluindo a própria comunidade da Vila do Maciel, órgãos de pesquisa e extensão e até autoridades sanitárias envolvidas com pescado e, especificamente, com bivalves.

## 8. CONCLUSÃO

As águas onde estão localizados os *longlines* na Vila do Maciel, PR, possuem *Vibrio* spp. com maior ocorrência de espécies não fermentadoras de sacarose (SAC<sup>-</sup>); O *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, ambos de grande relevância para saúde pública estão incluídos no grupo dos SAC<sup>-</sup>, portanto, 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;

Neste estudo, a quantidade de *Vibrio* spp. por litro de água é bem inferior aos valores encontrados na literatura, o que indica que o ambiente aquático em frente a Vila do Maciel, nas condições ora apresentadas, parecem adequadas à produção de ostras.

Para melhor e mais completa avaliação das condições microbiológicas da água de cultivo da Vila do Maciel, são necessários mais estudos que cubram todas as estações do ano.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 Brailleira**, Brasília, n.6, p.869-874, Jun 2012.

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

COSTA, R. A. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará.** 2006. 301 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FERREIRA, T. M. **Quantificação de bactérias do gênero *Vibrio* em Pontal do Sul, litoral do Paraná, PR.** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal do Paraná- 2013.

LIMA, A. S. ***Vibrio* em camarão e na água de três fazendas de carcinicultura do Ceará.** (Dissertação Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará - 2007

MENDES, E. S. Avaliação do exame a fresco em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) associado à contagem e identificação de *Vibrio* spp. em água de cultivo. **Medicina Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 7-15, 2011.

MPA Programas sanitários. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/monitoramento-e-controlempa/sanidade-pesqueira/programas-sanitarios/pncmb/sobre-pncmb>.

Acesso em 05/06/2014.



- 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. **Ciência Tecnologia Alimentícia**, Campinas, v.27, n2, p. 387-390, abr-jun. 2007.
- RODRIGUES, L. A. P. **Avaliação do risco microbiológico por *Vibrio parahaemolyticus* em ostras nativas (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas na Bahia de todos os Santos.** (Dissertação Pós Graduação em Ciência de Alimentos), Universidade Federal da Bahia, 2009.
- SICKEIRA, A.; KOLM H. E. Bacterioplâncton na desembocadura da Gamboa do Maciel, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Saúde e Ambiente/Health And Environment Journal**, Joinville, v. 6, n. 1, jun. 2005. Disponível em: <<http://periodicos.univille.br/index.php/RSA/article/viewArticle/65>>. Acesso em: 25 de maio 2014.
- TORTORA, G. J.; FUNKE B. R.; CASE C. L. **Microbiologia**. 10. ed. São Paulo: Artmed, 2012. 967 p.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718 p.
- 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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 6, p. 454-460, 2010.
- VIEIRA, R. H. S. F.; VASCONCELOS, R. F.; CARVALHO, E. M. R. Quantificação de vibrios, de coliformes totais e termotolerantes em ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*, e na água do estuário do Rio Jaguaribe, Fortim CE. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2007.