INCIDÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM ÁGUAS MARINHAS COSTEIRAS NA CIDADE DE JOÃO PESSOA - PB*

CRISTINA PAIVA DE SOUSA**

ANTONIO WILLIAM C. LIMA***

FREDDY R. CARBAJAL***

Relata-se no presente trabalho a incidência de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de 21 amostras de águas marinhas costeiras obtidas em diferentes praias do litoral de João Pessoa - PB. Detectou-se a presença de *V. parahaemolyticus* em 42,9% das amostras. Das 127 colônias isoladas, 35,4% eram típicas e 44,4% destas, positivas para o organismo. A contaminação média (NMP/ml) das amostras foi de $8,6 \times 10$, excluindo-se os valores menores que $3,0 \times 10$, sendo que 14,5% apresentaram-se contaminadas com número superior a 10^2 organismos/ml, representando risco potencial à saúde pública. Há, provavelmente, certa tendência de relação entre o local de coleta das amostras de água do mar com a época e temperatura das águas marinhas sobre o número de *V. parahaemolyticus*.

1 INTRODUÇÃO

Grande parte da produção mundial de alimentos não chega a ser utilizada porque, desde a sua produção ocorrem mudanças distintas que os fazem inaceitáveis para o consumo. Os alimentos podem ser alterados por reações enzimáticas, atividade microbiana, ataque de insetos e mudanças físicas. De todas elas, a ação dos microrganismos é a que contribui com maior percentual de alteração, chegando-se a considerar que mais de 10% da produção mundial de alimentos é destruída pela ação de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (1).

*Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

** Pesquisadora do Laboratório de Microbiologia Alimentar do Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba.

*** Professores Adjuntos do DQA da Universidade Federal da Paraíba.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o Vibrio parahaemolyticus é agente responsável por surtos de gastroenterite humana (15), além de ser enteropatógeno potencial de distribuição universal (17), sendo isolado em alimentos de origem marinha seja como contaminante ou como responsável por processos patogênicos em moluscos, crustáceos e também de águas estuarinas, neríticas e salobras em diversos países (7, 10). A sua presença nesses substratos é, pois, de importância à saúde pública.

Como a qualidade sanitária de produtos do mar deve-se ao grau de poluição da água de onde esses alimentos são coletados, destaca-se, à primeira vista, a necessidade de controle e análises microbiológicas da água do mar. A ocorrência de V. parahaemolyticus parece ser muito disseminada em águas costeiras e estuários de diversos países (3,4,6,9,14,15).

O litoral do Estado da Paraíba influencia sobremaneira os hábitos da população, principalmente através do consumo de frutos do mar, além de propiciar contato direto com as águas marinhas e estuarinas. Assim, visto que os trabalhos anteriormente citados evidenciam a importância da água como veículo eventual do Vibrio parahaemolyticus e pela ausência de dados no Estado da Paraíba e em particular, na cidade de João Pessoa sobre a ocorrência desta bactéria no ecossistema marinho, decidiu-se avaliar a incidência dessa bactéria em águas coletadas no litoral de João Pessoa-PB.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Analisou-se 21 amostras de água do mar coletadas em diferentes praias do litoral de João Pessoa - PB, obedecendo-se o sentido de orientação sul-norte (Figura 1), no período de dezembro de 1987 a setembro de 1988. As amostras de água marinha foram coletadas nas praias da Penha (amostras A), Seixas (amostras B), Cabo Branco (amostras C), Tambaú (amostras D), Manaíra (amostras E), Beça (amostras F) e Intermares (amostras G). Em cada uma das praias recolheu-se três amostras em pontos escolhidos aleatoriamente. Realizou-se as coletas em águas costeiras a profundidade de 80cm $\pm$ 20 cm, registrando-se as temperaturas correspondentes. As amostras foram coletadas em erlenmeyers estéreis e transportadas em isopor contendo cubos de gelo ao laboratório. O tempo transcorrido desde a obtenção das amostras até as análises laboratoriais foi de seis horas no máximo.

2.2 Diluição (LANARA, 11, modificado por SOUSA & LIMA, 18)

Utilizou-se como diluente água peptonada 0,1% adicionando-se 3% de cloreto de sódio, tendo em vista que a peptona atua como mineralizador de células estressadas do V. parahaemolyticus e apresenta melhores resultados.

Para se obter a diluição 10^{-1} tomou-se 50 ml de água do mar e diluiu-se em 450 ml de água peptonada 0,1% + 3% de NaCl.

FIGURA 1 - LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE AMOSTRAGEM

FONTE: Base cartográfica - Folha SB. 25-Y-C-III.

2.3 Exame microbiológico (11)

Após o enriquecimento seletivo para *V. parahaemolyticus* usando-se caldo glicose sal teepol, uma alçada de cada tubo positivo foi semeado em placas de ágar tiosulfato citrato sacarose sais biliares e incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$, por 24-48 horas. De cada placa se lecionou-se de 1 a 5 colônias suspeitas que foram submetidas aos testes de: a) motilidade em ágar sal 3%; b) crescimento em caldo peptonado sal 3%; c) crescimento em ágar nutritivo sal 3% e d) comportamento em ágar triplice açúcar ferro sal 3%. Os tubos foram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$, por 24 horas e os que apresentaram características típicas do organismo foram submetidos às provas bioquímicas seguintes: a) resistência a cloreto de sódio em caldo peptonado sal 3%, 7% e 10%; b) crescimento a 42°C ; c) prova de Hugh-Leifson sal 3% glicose; d) prova da descarboxilação da lisina e deidrolização da argina e e) prova da fermentação de carboidratos.

2.4 Número mais provável (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus*

Foi determinado o NMP através da identificação das colônias que se comportaram como *V. parahaemolyticus* nos meios de enriquecimento, isolamento, triagem e nas provas bioquímicas utilizadas. Assim confirmou-se a positividade para a bactéria no caldo glicose sal 3% teepol e, utilizando-se a tabela de Hoskins, calculou-se o NMP correspondente do microrganismo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sobre a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em águas marinhas são vistos na Tabela 1. Observa-se que 42,9% das amostras de água do mar encontravam-se contaminadas pelo microrganismo, com valores mais elevados que os citados por VANDERZANT et alii (20). Esses autores encontraram 30% de incidência do organismo nas águas e sedimentos da baía de Galveston, USA. LEITÃO & ARIMA (12) obtiveram média de contaminação similar com 45% de positividade para amostras de água e 21,6% para sedimentos no litoral de São Paulo. GELLI et alii (8) detectaram 75% de positividade para o organismo em águas do litoral de São Paulo.

TABELA 1 - OCORRÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM ÁGUAS MARINHAS NA CIDADE DE JOÃO PESSOA - PB

NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS	AMOSTRAS POSITIVAS	
	(nº)	(%)
21	09	42,9

A elevada incidência (42,9%) da bactéria nas águas do litoral de João Pessoa, constata as observações de outros autores, demonstrando que o *V. parahaemolyticus* apresenta ampla distribuição no ambiente marinho (8,12,13,14,20), não se restringindo apenas às águas do litoral japonês, como suposto anteriormente.

A variação na microbiota de *V. parahaemolyticus* em águas do mar foi ampla conforme resultados das Tabelas 2 e 3. Esses resultados também são concordantes com aqueles obtidos por outros autores (12,13,14,20).

TABELA 2 - VARIAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus*/ML EM ÁGUAS MARINHAS DE ACORDO COM A ÉPOCA E O LOCAL DA COLETA

LOCAL	Nº DE AMOSTRAS	NMP DE <i>V. parahaemolyticus</i> /ml	ÉPOCA	
			MES	ANO
Penha	1	3,0 x 10*	set.	1988
	2	3,0 x 10*	set.	1988
	3	4,0 x 10	set.	1988
Seixas	4	3,0 x 10	ago.	1988
	5	4,0 x 10	ago.	1988
	6	4,0 x 10	ago.	1988
Cabo Branco	7	4,0 x 10	jan.	1988
	8	4,0 x 10	jan.	1988
	9	3,0 x 10	jan.	1988
Tambaú	10	1,5 x 10 ²	dez.	1987
	11	2,3 x 10 ²	dez.	1987
	12	1,5 x 10 ²	dez.	1987
Manaíra	13	3,0 x 10*	abr.	1988
	14	3,0 x 10*	abr.	1988
	15	3,0 x 10*	abr.	1988
Bessa	16	4,0 x 10	maio	1988
	17	3,0 x 10*	maio	1988
	18	3,0 x 10	maio	1988
Internares	19	3,0 x 10*	jul.	1988
	20	3,0 x 10*	jul.	1988
	21	3,0 x 10	jul.	1988

* Não ocorreu turvação em nenhum dos tubos de caldo glicose salteepol.

Dos resultados das análises de amostras de água do mar pode-se verificar certa influência do local e da época de coleta sobre a incidência quantitativa do *V. parahaemolyticus* como expressa a Tabela 4. Evidencia-se, por esses resultados, a ocorrência da bactéria, em maior proporção, nos meses mais quentes do ano. Assim, nos meses de dezembro, janeiro e agosto, nas praias de Tambaú (100%), Cabo Branco (66,7%) e Seixas (66,7%) obteve-se os maiores índices de amostras positivas. Tais resultados são análogos aos encontra-

dos por LEITÃO & ARIMA (12) que observaram, na enseada de Santos, Estado de São Paulo, a variação de positividade de 17,5% nos meses mais frios para 30% e 88% nos meses de verão. SAKAZAKI (16), assim como BAROSS & LISTON (2), encontraram também a incidência reduzida da bactéria nas águas e sedimentos durante os meses de inverno. Verificou-se que a incidência do organismo é mais acentuada, provavelmente nas águas sujeitas à poluição provocada pelos esgotos clandestinos, vendedores ambulantes de alimentos e de lixo doméstico. Para COLWELL et alii (6) a presença do microrganismo em estudo parece ser restrita às regiões costeiras, estuários e zonas de maior poluição, havendo estreito relacionamento com o zooplâncton.

TABELA 3 - VARIAÇÃO NA MICROFLORA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM ÁGUAS MARINHAS COSTEIRAS NA CIDADE DE JOÃO PESSOA - PB

Nº de amostras	NMP de <i>V. parahaemolyticus</i> / ml				Variação nas contagens	
	30 Nº %	30-10 ² Nº %	10 ² -10 ³ Nº %	10 ³ Nº %	Máxima	Mínima
21	12 57,0	6 28,6	3 14,3	0 0,0	2,3 x 10 ²	4,0 x 10

* excluindo-se os resultados menores que 3,0 x 10.

TABELA 4 - VARIAÇÃO PROVÁVEL DA TENDÊNCIA SAZONAL SOBRE A INCIDÊNCIA DE *V. parahaemolyticus* EM ÁGUAS MARINHAS

LOCAL DE AMOSTRAGEM	ÉPOCA	TEMPERATURA DA AMOSTRA (°C)	AMOSTRAS Nº	POSITIVAS %
Tambáú	Dez/87	30	03	100,0
Cabo Branco	Jan/88	28	02	66,7
Manáira	Abr/88	22	00	00,0
Bessa	Maio/88	22	01	33,7
Intermares	Jul/88	21	00	00,0
Seixas	Ago/88	25	02	66,7
Penha	Set/88	23	01	33,3
TOTAL			09	

A Tabela 5 permite avaliação das etapas empregadas para a confirmação dos cultivos estudados, a saber: a) isolamento de colônias suspeitas em ágar TCBS, b) triagem em ágar motilidade sal 3%, caldo peptonado sal 3%, ágar nutritivo sal 3% e ágar TSI sal 3% e c) testes bioquímicos adicionais. O número de colônias suspeitas isoladas das amostras de água do mar foi de 127, com 35,4% de cepas que se comportaram como *V. parahaemolyticus* nos meios de triagem e 15,8% de cultivos confirmados da bactéria. Assim, conclui-se ha

ver necessidade prémente de realização de numerosos testes bioquímicos, visando a correta identificação da bactéria.

TABELA 5 - INCIDÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM ÁGUAS MARI-NHAS DA CIDADE DE JOÃO PESSOA PB

LOCAL	Nº DE AMOSTRAS	COLÔNIAS		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ³
		Isoladas ¹	Típicas ²	
Penha	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	05	01	01
Seixas	4	01	-	-
	5	12	05	02
	6	10	03	01
Cabo Branco	7	10	05	03
	8	08	06	02
	9	11	04	-
Tambau	10	13	03	03
	11	15	03	03
	12	22	03	03
Manaira	13	-	-	-
	14	-	-	-
	15	-	-	-
Bessa	16	10	07	02
	17	-	-	-
	18	08	03	-
Intermares	19	-	-	-
	20	-	-	-
	21	02	02	-

¹Número de colônias isoladas em ágar TCBS;

²Colônias típicas que foram submetidas à triagem;

³Colônias típicas que foram submetidas aos testes bioquímicos adicionais.

Na Tabela 6, observa-se o comportamento bioquímico das cepas isoladas das amostras coletadas nos vários pontos do litoral. Estas cepas comportaram-se diferentemente frente às diferentes reações bioquímicas propostas por SAKAZAKI (16) com as reações usuais de

Vibrio parahaemolyticus. Há ampla variação de positividade 35 a 100% para água do mar nas respostas bioquímicas para as colônias isoladas. Este intervalo prende-se, presumidamente, a presença de outros vibrios marinhos (V. alginolyticus, V. anguillarum, V. natriegens) e de outros organismos similares a vibrios.

A porcentagem de colônias confirmadas bioquimicamente como V. parahaemolyticus em água do mar (Tabela 7) é inferior ao encontrado por LEITÃO & ARIMA (12) que obtiveram 31,7% de confirmação de colônias. VANDERZANT & NICKELSON (19) mencionaram numerosas culturas com reações típicas em ágar TCBS, mas que produziram H_2S em TSI ou eram oxidase negativas, divergindo das características bioquímicas do V. parahaemolyticus. BAUMANN et alii (5) citam várias espécies marinhas com reações semelhantes às de V. parahaemolyticus, em particular no fato de serem sacarose-negativas. SA KAZAKI (16) faz referências a Vibrio spp 6330 e Vibrio spp 6267 como podendo apresentar ausência de capacidade de fermentar a sacarose. Estas observações poderiam explicar, em parte, a diversidade e a baixa porcentagem de confirmações de cepas da bactéria a partir de colônias suspeitas em ágar TCBS.

TABELA 7 - RELAÇÃO DE CEPAS CONFIRMADAS BIOQUIMICAMENTE COMO Vibrio parahaemolyticus COM O NÚMERO DE COLÔNIAS SUSPEITAS ISOLADAS EM ÁGAR TCBS E COLÔNIAS TÍPICAS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR

NÚMERO DE COLÔNIAS		<u>Vibrio parahaemolyticus</u>	
Isoladas	Típicas	Nº	%
127	45 (35,4%)	20	15,8

4 CONCLUSÕES

Das amostras analisadas de água do mar, obteve-se 42,9% de positividade para o V. parahaemolyticus e 15,8% de culturas confirmadas.

A contaminação média (NMP/ml) foi de $8,6 \times 10$, excluindo-se os valores menores que $3,0 \times 10$.

Observou-se certa tendência de relação entre o local e a temperatura das águas. Nos meses mais quentes, verificou-se positividade de 100 a 66,7% e variação de 0 a 33,3% de amostras positivas nos meses com temperatura mais baixa.

Das 21 amostras analisadas, 14,3% apresentaram-se contaminadas com número superior a 10^2 organismos/ml.

Abstract

It is related in this paper, the incidence of Vibrio parahaemolyticus in 21 samples of marine coastal waters collected in various places of Joao Pessoa -PB-Brazil. It was detected V. parahaemolyticus in 42,9% of the samples. In 127 isolated colonies, 35,4 were typical and 44,4% of these, were positive for the microorganism. The average contamination (NMP/ml) was $8,6 \times 10$, excluded the minor results $3,0 \times 10$, and 14,5% were contaminated with a number superior to 10^2 organisms/ml, representing public health hazard. It was observed some influence in the number of V. parahaemolyticus by the

TABELA 6 - COMPORTAMENTO DE CEPAS IDENTIFICADAS COMO *Vibrio parahaemolyticus* ISOLADAS DE ÁGUAS MARINHAS EM TESTES BIOQUÍMICOS

TESTE BIOQUÍMICO	REACÇÃO USUAL ¹	Nº CULTURAS TESTADAS	CULTURAS TÍPICAS Nº %	CULTURAS CONFIRMADAS COMO <i>V. PARAHAEVOLYTICUS</i> Nº %
Motilidade	+	127	50 39	-
Ágar nutritivo sal 3%	+	127	80 62	-
Ágar TSI	A/K ²	127	45 35	-
Hugh-Leifson aberto ³	Am ⁺ (100%)	127	115 90	-
Hugh-Leifson fechado	Am ⁺ (100%)	127	115 90	-
Crescimento a 42°C	+	127	74 58	-
Crescimento em caldo peptonado sal 3%	+(100%)	127	127 100	20 15,7
Crescimento em caldo peptonado sal 7%	+(100%)	127	127 100	-
Crescimento em caldo peptonado sal 10%	-(99,4%)	127	100 78	-
Crescimento em caldo arginina desidrolase	-(100%)	127	103 81	-
Crescimento em caldo lisina descarboxilase	+(100%)	127	100 78	-
Fermentação manitol	+(99,6%)	127	98 77	-
Fermentação sacarose a 1%	-(94,7%)	127	80 62	-

+ = reacção positiva
- = reacção negativa
1 Segundo SHKAZAKI (1973)
2 A = ácido - K = alcalino
3 = amarelo positivo

sampling local and period of collection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 BANWART, G.J. Basic food microbiology. Westport : AVI, 1981. 519 p.
- 02 BAROSS, J., LISTON, J. Isolation of Vibrio parahaemolyticus from the Northwest Pacific. Nature, v. 217, p. 1263-4, 1968.
- 03 _____. Occurrence of Vibrio parahaemolyticus and related hemolytic vibrios in marine environment Washington State. Applied Microbiology, v. 20, p. 199-206, 1970.
- 04 BARROS, C.G., VIANNI, M.C.E. Vibrio parahaemolyticus: isolamento e identificação em águas da Baía da Guanabara. R.Lat. Amer. Microbiol., v. 22, p. 163-169, 1980.
- 05 BAUMANN, P., BAUMANN, L., MENDEL, M. Taxonomy of marine bacteria: the genus Beneckeia. Journal of Bacteriology, v. 107, p. 268-294, 1971.
- 06 COLWELL, R.R., LOVELACE, T.E., WAN, L., KANEKO, T., STALEY, T., CHEN, P.K., TUBIASH, H. Vibrio parahaemolyticus: isolation, identification, classification and ecology. Journal Milk of Food Technology, v. 35, p. 202-213, 1973.
- 07 EYLES, M.J., DAVEY, G.R., ARNOLD, G. Behavior and incidence of Vibrio parahaemolyticus in Sydney rock oysters (Crassostrea commercialis). International Journal of Food Microbiology, v. 1, n. 6, p. 327-334, 1985.
- 08 GELLI, D.S., TACHIBANA, T., SILVA, T.P.M. Ocorrência de Vibrio parahaemolyticus em ostras e outros produtos marinhos no litoral de São Paulo, Brasil. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 35/36, p. 9-16, 1975/76.
- 09 HORIE, S., SAHEKI, K., OKUZUMI, M. Quantitative enumeration of Vibrio parahaemolyticus in sea and estuarine waters. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, v. 33, p. 126-130, 1967.
- 10 JOSEPH, S.W., COLWELL, R.R., KAPER, J.B. Vibrio parahaemolyticus and related halophilic vibrios. Critical Review Microbiological, v. 10, p. 77-124, 1983.
- 11 LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL - LANARA. Métodos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília, 1981. v. 1 (métodos microbiológicos).
- 12 LEITÃO, M.F.F., ARIMA, H.K. Vibrio parahaemolyticus no ambiente marinho do Estado de São Paulo. I. Ocorrência na água e avaliação da metodologia para isolamento. Coletânea do ITAL, v. 6, p. 149-166, 1975.

- 13 MOLITORIS, E. et al. Characterization and distribution of Vibrio alginolyticus and Vibrio parahaemolyticus isolated in Indonesia, Applied Microbiology, v. 50, p. 1388-1394, 1985.
- 14 RODRIGUES, D.P., HOFER, E. Vibrio species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. Revista de Microbiologia, v. 17, n. 4, p. 332-38, 1986.
- 15 SAKAZAKI, R. Halophilic vibrio infections. In: RIEMANN, H. Food-borne infections and intoxications. New York : Academic Press, 1969. p. 115-29.
- 16 _____. Control of contamination with Vibrio parahaemolyticus in seafood and isolation and identification of the Vibrio. In: HOBBS, B.C., CHRISTIAN, J.H.B. (ed.) The microbiological safety of foods. London : Academic Press, 1973. p. 375-385.
- 17 _____. Vibrio parahaemolyticus as a food-spoilage organism. Economic Microbiology, v. 8, p. 225-241, 1983.
- 18 SOUSA, C.P., LIMA, A.W.O. Isolamento e identificação de Vibrio parahaemolyticus em águas marinhas costeiras do litoral de João Pessoa - PB. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (1988 : Recife) Resumos dos trabalhos ... Recife, 1988. p. 171.
- 19 VANDERZANT, C., NICKELSON, R. Procedure for isolation and enumeration of Vibrio parahaemolyticus. Applied Microbiology, v. 23, p. 26-33, 1972.
- 20 VANDERZANT, C., THOMPSON JR., C.A., RAY, S.M. Microbial flora and level of Vibrio parahaemolyticus of oysters (Crassostrea virginica), water and sediment from Galveston Bay. Journal Milk Food Technology, v. 36, n. 9, 447-454, 1973.