

## ***Vibrio parahaemolyticus* ISOLADOS DE *Farfantepenaeus paulensis* PROVENIENTES DO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS**

NATÁLIA VOLPATO DA CONCEIÇÃO<sup>1</sup>; JANAINA VIANA DA ROSA<sup>2</sup>; CLÁUDIO DIAS TIMM<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – natalia-volpato@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – janavrosa@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

A preocupação com a alimentação saudável e qualidade de vida vem crescendo entre a população, com isso há o aumento da procura por alimentos que tragam benefícios à saúde. As características nutricionais dos pescados fazem deles um alimento privilegiado devido às proteínas, vitaminas, nutrientes e gorduras insaturadas, com propriedades hipotensoras, capacidade de reduzirem problemas cardiovasculares e agregação plaquetária (COSTA et al., 2007). Entretanto, a questão da saúde pública, referindo-se à segurança alimentar, é uma preocupação (LUCIANO, 2009).

*Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa) ocorre ao longo da região costeira brasileira, a partir de Ilhéus, Bahia, estendendo-se pela região do Uruguai até o litoral nordeste da Argentina (D'INCAO, 1991). A Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul (RS), possui uma comunicação estuário-oceano que é influenciada por fatores meteorológicos, os quais interferem na entrada de água marinha (MÖLLER et al., 2009), devido a este fator o período de safra do camarão é durante o verão e início de outono no estuário. Apesar da produção pesqueira do estuário atingir valores de até 8.000 toneladas em alguns anos, as safras anuais médias são de 3.500 toneladas. Em outros momentos a safra é inexistente, acarretando desemprego e diminuindo a renda dos trabalhadores ligados ao setor (KRUMMENAUER et al., 2006).

*Vibrio* é um gênero de bactérias Gram-negativas, móveis, geralmente com um único flagelo polar (LIMA, 1997) encontrado principalmente durante o verão em águas salobras (MILAN et al., 2015). Pertence à flora autóctone do meio ambiente marinho (COSTA et al., 2009), sendo, consequentemente, uma fonte constante de possíveis contaminações para animais marinhos. A presença de *Vibrio parahaemolyticus* em frutos do mar é preocupante visto que a bactéria pode provocar doenças em humanos quando há o consumo de alimentos contaminados, causando quadros clínicos que cursam com gastroenterites, infecções em feridas e septicemias (COSTA et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *V. parahaemolyticus* em *F. paulensis* prontos para o comércio.

### **2. METODOLOGIA**

Para obtenção das amostras, foram realizadas 12 coletas de *F. paulensis*, no mercado público da cidade de Pelotas, RS, durante o período de safra, nos meses de fevereiro a abril de 2016. As amostras foram colocadas em saco estéril e imediatamente encaminhadas em caixas isotérmicas com gelo ao laboratório para análise.

A pesquisa de *Vibrio* spp. foi realizada conforme recomendado por U. S. Food and Drug Administration - FDA (KAYSNER; DEPAOLA., 2004), com

modificações. Foram colocados 25 g de *F. paulensis* em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia), e os quais foram massageados por 5 minutos e incubados a 37°C por 24 horas para enriquecimento. A partir do material dessas culturas, foram feitas semeaduras por esgotamento em ágar Tiosulfato Citrato Bili Sacarose (TCBS, Himedia) e incubação a 37°C por 24 horas para obtenção de colônias isoladas. Até três colônias típicas de cada placa foram semeadas em APA e, após incubação a 37°C por 24 horas, foram misturadas com 20% de glicerol para manutenção de estoque a -70 °C.

A extração do DNA de *Vibrio* spp. foi realizada conforme SAMBROOK; RUSSEL (2001). Resumidamente, o pellet obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em APA, foi ressuspensionado em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Foram adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -70°C por 30min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20min, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4), foi adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -70°C.

A identificação de *V. parahaemolyticus* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes *toxR*, utilizando os primers GTCTTCTGACGCAATCGTTG e ATACGAGTGTTGCTGTCATG, conforme BILUNG et al. (2005), com modificações. Cada reação teve um volume final de 20 µL. Foram utilizados 10 µL de Master Mix, 1 µL (10 pmol) de cada primer, 1,2 µL de DNA e 6,8 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 com o seguinte programa: desnaturação inicial de 96°C por 5min, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento dos primers a 63°C por 1,5min, extensão a 72°C por 1,5min e extensão final a 72°C por 7min. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,8%. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

*V. parahaemolyticus* foi isolado de 16,66% (2/12) das amostras, as quais foram obtidas nos meses de fevereiro e março.

Em um estudo anterior realizado na cidade de Pelotas por MILAN et al. (2015) foram analisadas 56 amostras de pescados, capturados no estuário da Lagoa dos Patos, dentre os quais 13 eram da espécie *F. paulensis*. Destes, 46,15% (6) estavam contaminados com *V. parahaemolyticus*, sendo a maioria dos isolados obtidos nos meses de verão. Outro estudo realizado em Natal, Rio Grande do Norte, isolou *V. parahaemolyticus* de 20% (10/50) das amostras de outra espécie de camarão, *Litopenaeus vannamei*, coletadas em supermercados no período de agosto a setembro de 2007 (MELO et al., 2011). Esta diferença de resultado dos trabalhos citados em comparação com o nosso pode ser devido às diferenças de temperaturas, visto que, a cidade de Natal no ano de 2007 apresentava temperatura média de 27°C (NATAL, 2008), e em Pelotas no ano de 2015 a temperatura média foi de 23,6°C (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2016), diferentemente de quando houve a coleta para a realização deste trabalho, que apresentava a temperatura média de 21,3°C (EMBRAPA CLIMA

TEMPERADO, 2016). A diferença de temperatura pode interferir na multiplicação da bactéria.

A qualidade do pescado pode ser influenciada pela ausência de hábitos higiênicos durante a manipulação, superfícies contaminadas e utensílios não sanitizados (DAMS et al., 1997), além da contaminação prévia pela água a qual o pescado habitava. Supondo-se que a contaminação de *F. paulensis* por *V. parahaemolyticus* seja causada por estes motivos é importante ressaltar as questões de higiene, além de evitar o consumo de alimentos crus ou mal cozidos, visto que a alta temperatura elimina o patógeno (MENDES et al., 2009).

#### 4. CONCLUSÕES

Camarões da espécie *F. paulensis* capturados no estuário da Lagoa dos Patos pode albergar *V. parahaemolyticus*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILUNG, M.L. et al. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (Anadarageanosa). **American Journal of Immunology**, Austrália, v.1, p.31-36, 2005.

COSTA, P.; FONTANA, A.; VEIGA, I.; PRENTICE, C. Caracterização funcional e nutricional de um isolado protéico obtido a partir de resíduos de camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.18, n.1, p.7-18, 2007.

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

D'INCAO, F. Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos, RS. **Atlântica**, Rio Grande, RS, v.13, n.1, p.159- 169, 1991.

DAMS, R.I.; TEIXEIRA, E.; BEIRÃO, L.H. Práticas de higiene e sanitização em indústria de pescado congelado. **Boletim do centro de pesquisa e processamento de alimentos**, Curitiba, v.15, n.2, p. 160-166, 1997.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Dados metereológicos de Pelotas em tempo real**. Laboratório de Agrometeorologia, Porto Alegre, 17 jul. 2016. Acessado em 17 jul. 2016. Online. Disponível em: <http://agromet.c pact.embrapa.br>

KAYSNER, C.A.; DEPAOLA, J. *Vibrio*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM), 2004. Disponível em: Acesso em: 18 de março 2015.

KRUMMENAUER, D.; JÚNIOR, W.; CAVALLI, R.; PEIXOTO, S.; ZOGBI, P. Viabilidade do cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Crustácea, Decapoda) em gaiolas sob diferentes densidades durante o outono no sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p. 252-257, 2006.

LIMA, F.C. *Vibrios* marinhos II. *Vibrios* não coléricos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n. 49, p. 813, 1997.

LUCIANO, L.G. **Qualidade microbiológica de peixes e frutos do mar em Botucatu**. 2009. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista.

MELO, L.; ALMEIDA, D.; HOFER, E.; REIS, C.; THEOPHILO, G.; SANTOS, A.; VIEIRA, R. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* marketed in Natal, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, vol.42, n.4, 2011.

MENDES, E.; LIRA, S.; GÓES, L.; DOURADO, J.; MENDES, P.; ALVES, C. *Vibrio spp.* Isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Revista Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v.10, n.4, p. 1191-1199, 2009.

MILAN, C.; SILVEIRA, D.; ROSA, J.; TIMM, C. *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.74, n.2, p. 151-155, 2015.

MÖLLER, O. CASTELLO, J. VAZ, A. The effect of river discharge and wind on the interannual variability of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* production in Patos lagoon. **Estuaries and coasts**, Charlottesville, v.32, n.4, p. 787-796, 2009.

NATAL, prefeitura municipal do. Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Urbanismo. TÍTULO ASPECTOS FÍSICOS E BIOLÓGICOS. In: PREFEITURA MUNICIPAL DO NATAL. Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Urbanismo. **Anuário Natal 2007**. Natal: KMP gráfica e editora LTDA, 2008. Cap.4, p.132.