CAROLINE VIANA MARKMAN

**CARACTERIZAÇÃO DE *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* E *V. vulnificus* EM
AMOSTRAS DA REGIÃO COSTEIRA DO ESTADO DE SÃO PAULO, DE REGIÕES
PORTUÁRIAS BRASILEIRAS E DE TANQUES DE LASTRO DE NAVIOS.**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Microbiologia).

**São Paulo
2008**

CAROLINE VIANA MARKMAN

**CARACTERIZAÇÃO DE *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* E *V. vulnificus* EM
AMOSTRAS DA REGIÃO COSTEIRA DO ESTADO DE SÃO PAULO, DE REGIÕES
PORTUÁRIAS BRASILEIRAS E DE TANQUES DE LASTRO DE NAVIOS.**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Irma Nelly
Gutierrez Rivera.

São Paulo

2008

À minha querida mãe, pelo seu total apoio, paciência e incentivo, principalmente nas horas mais difíceis.

À minha filha adorada Larissa, razão plena do meu viver.

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dr^a. Irma N. G. Rivera pela orientação, ensinamentos e paciência ao longo destes anos de convivência.

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado durante quatro anos e do programa PAE, durante um ano.

Aos profs. Drs. Claudete Rodrigues de Paula e Vivian H. Pellizari por permitirem o uso dos laboratórios e aparelhos.

À Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA/Ministério da Saúde, Fundação de Estudos de Pesquisas Aquáticas – FUNDESPA e Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO/OMS) pelo suporte e parceria na realização deste trabalho.

Aos profs. Drs. Fabiano L. Thompson, Marisa Landgraf, Maria Inês Zanolli Sato, Glavur Matté e Antônio Pestana pelas preciosas sugestões na avaliação do trabalho de qualificação.

À secretária da pós-graduação Alice, pelo auxílio e amizade durante todos estes anos.

Aos funcionários Luis Constantino, Rosa Gamba, Naíde e Aninha pela colaboração, assistência técnica e apoio.

À minha grande e querida amiga bióloga Zelma Fernandes Marinho que sempre me apoiou, incentivou, ouviu minhas reclamações, me deu orientação nas horas difíceis e fez destes anos de convivências mais alegres. Valeu!

Aos colegas e amigos de outros laboratórios, Priscila, Zé Edu, Adeláide, Maria do Carmo, Alejandra, Fabio, Fernando, Liuthas, Débora, Arianna, Larissa e Miriam.

Aos amigos do laboratório Bianca, Claudiana, Gislaine, Renata, Neilza, Bruna, Oyama e Lilian pela convivência e amizade, em especial à Mariela.

Aos meus grandes amigos Alessandra Machado, Mário Armando, Solange Lessa e Alexandra pela amizade sincera e horas de gargalhadas!

A toda minha família, pai, irmão, cunhada, tias, tios, primos e primas, obrigada pelo incentivo e apoio.

"De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre a começar,
a certeza de que é preciso continuar,
e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

Portanto, devemos:
fazer da interrupção um caminho novo,
da queda, um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
da procura, um encontro." - Fernando Sabino

RESUMO

Os ambientes costeiros estão sob constante influência antropogênica visto que é um dos habitats que concentram maiores índices populacionais, sendo que no Brasil, 18% da população do país residem nestas áreas. A zona costeira brasileira é composta por diversos ambientes, muitos deles extremamente frágeis, em acentuado processo de degradação gerado pela crescente ocupação. Um dos impactos antrópicos mais significantes para alteração deste ecossistema é o despejo de água de lastro dos navios, devido à grande introdução de espécies não-nativas. A introdução de espécies marinhas invasoras em novos ambientes pela água de lastro transportada nos navios e outros vetores têm sido identificadas como um dos quatro maiores perigos aos habitats oceânicos. Os outros três são a poluição marinha derivada de fontes terrestres, exploração excessiva dos recursos marinhos e alteração/destruição física do habitat marinho. As diferentes espécies encontradas dentro do gênero *Vibrio* podem ter diferentes nichos ecológicos, mas em geral são tipicamente de ambientes estuarinos ou/e marinhos, sendo necessária a compreensão profunda destes sistemas ecológicos para se entender sua ecologia global. Assim foram pesquisadas em amostras de água, plâncton e moluscos bivalves coletadas da região costeira de São Paulo, de regiões portuárias brasileiras e de tanques de lastro de navios, bactérias das espécies *Vibrio cholerae* (Vc), *V. parahaemolyticus* (Vp) e *V. vulnificus* (Vv) que são as espécies que têm maior implicação na saúde pública. Foram avaliados parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, salinidade e condutividade) e microbiológicos (bactérias viáveis marinhas, coliformes termotolerantes, enterococos intestinais, *Clostridium perfringens* e colifagos) e suas relações com as contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*, *Vibrio* spp e a presença de Vc, Vp e Vv. As relações clonais entre as cepas identificadas foram verificadas através das técnicas de ERIC, BOX e REP-PCR. No total foram identificadas 90 cepas de Vp *tdh/trh* negativos e 11 de Vc *ctxA/tcpA* negativos. Foram observadas correlações positivas entre a contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* (CV) e pH, contagem de vibrios em plâncton, CV e contagem de bactérias viáveis marinhas e CV e enterococos intestinais. A análise clonal permitiu verificar a alta diversidade das cepas e suas regiões de origem. Concluiu-se que Vc e Vp são autóctones do ambiente costeiro brasileiro, entretanto podem atuar como reservatórios naturais se transformando em cepas epidêmicas, principalmente em locais onde existe uma alta atividade antropogênica, podendo inclusive serem disseminados via água de lastro de uma região para outra, se tornando um perigo para o ambiente aquático costeiro.

ABSTRACT

Coastal environments are under constant anthropogenic influence because they attract high population densities. In Brazil, 18% of the population inhabits these areas. The Brazilian coastal zone consists of diverse environments, many of them extremely fragile, and undergoing noticeable degradation from the increasing human occupation. One of the more significant anthropogenic impacts for the alteration of this ecosystem is the release of ship ballast water, which leads to the introduction of numerous non-native species. The introduction of these alien species into new environments, whether through ballast water carried in the ships or through other vectors, has been identified as one of the four greatest dangers to habitats. The other three are marine pollution derived from terrestrial sources, excessive exploitation of marine resources and alteration or physical destruction of marine habitats. The various species within the genus *Vibrio* likely have various ecological niches, but, in general, are typically of marine or estuarine environments. A deep knowledge of these ecological systems would be necessary for understanding their overall ecology. We examined, in samples of water, plankton and bivalve clams, collected variously from the coastal region of São Paulo, Brazilian ports and ballast tanks of ships, *Vibrio cholerae* (Vc), *V. parahaemolyticus* (Vp) and *V. vulnificus* (Vv), the three species that have the most significant implications for public health. The samples were evaluated for physical-chemical (temperature, pH, salinity and conductivity) and microbiological (viable marine bacteria, thermotolerant coliforms, intestinal enterococci, *Clostridium perfringens* and coliphages) parameters, including their relationships with the numbers of presumptive members of the family *Vibrionaceae*, *Vibrio* spp and in particular, the presence of Vc, Vp and Vv. The clonal relationships among the identified strains had been determined by ERIC, BOX and REP-PCR. A total of 90 strains of Vp *tdh/trh* negatives and 11 Vc *ctxA/tcpA* negatives were identified. Positive correlations between the counts of presumptive members of the *Vibrionaceae* family (CV) and pH, CV and counts of vibrios in plankton, CV and counts of viable marine bacteria and CV and intestinal enterococci were observed. Clonal analysis revealed a high diversity of strains and their regions of origin. It was concluded that Vc and Vp are autochthonous bacteria of the Brazilian coastal environment, which can, however, act as natural reservoirs and can transform into epidemic strains, especially in places where there are high levels of anthropogenic activity. These virulent strains can then spread through ballast water from one region to another, becoming a danger for the entire coastal aquatic environment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Zonas marinhas.....	1
Figura 2 - Classificação da costa brasileira.....	4
Figura 3 - Síntese da atividade de maricultura no Brasil, quanto à produção de camarão e moluscos.....	8
Figura 4 - Vista do corte através de um navio mostrando os tanques de lastro e o ciclo da água de lastro.....	12
Figura 5 - Componentes genéricos da Análise de Riscos.....	15
Figura 6 - Diagrama de fluxo genérico para fontes de riscos microbiológicos no contexto de água de consumo.....	18
Figura 7 - Casos de cólera registrados no Brasil de 1991 a 2006.....	27
Figura 8 – Áreas de amostragem no Estado de São Paulo, Brasil.....	41
Figura 9 - Localização dos pontos de amostragem em São Sebastião, S. P.	42
Figura 10 - Localização dos pontos de amostragem em Ubatuba, S. P.	44
Figura 11 - Localização dos pontos de amostragem em Santos, S. P.	46
Figura 12 - Vista panorâmica do porto de Belém (PA).....	47
Figura 13 - Pontos de coleta no porto de Belém (PA)	47
Figura 14 - Vista panorâmica do Porto de Rio Grande (RS).....	48
Figura 15 - Pontos de coleta no porto de Rio Grande (RS).....	49
Figura 16 - Vista panorâmica do Porto de Fortaleza (CE).....	50
Figura 17 - Pontos de coleta no porto de Fortaleza (CE).....	51
Figura 18 - Vista panorâmica do porto de Paranaguá (PR).....	51
Figura 19 - Pontos de coleta no porto de Paranaguá (PR).....	52
Figura 20 - Vista panorâmica do porto de Recife (PE).....	53
Figura 21 - Pontos de coleta no porto de Recife (PE).....	54
Figura 22 - Vista panorâmica do porto de Santos (SP).....	55

Figura 23 - Pontos de coleta no porto de Santos (SP).....	56
Figura 24 - Vista panorâmica do Porto de Itaguaí (RJ).....	56
Figura 25 - Pontos de coleta no porto de Itaguaí (RJ).....	57
Figura 26 - Coleta de amostra de água de regiões portuárias brasileiras e região costeira do Estado de S. Paulo.....	58
Figura 27 - Coleta de amostra de água do tanque de lastro de navio.....	59
Figura 28 - Coleta de amostra de plâncton de água do mar.....	60
Figura 29 - Coleta de amostra de plâncton do lastro de navio.....	60
Figura 30 - Amostras identificadas de Moluscos Bivalves.....	61
Figura 31 - Gráficos Box-plot obtidos das contagens de Bactérias Viáveis Marinhas, Coliformes Termotolerantes, Enterococos Intestinais e Colifagos em amostras de água coletadas na região costeira do Estado de São Paulo.....	70
Figura 32 - Gráficos Box-Plot obtidos das contagens de membros presuntivos da família <i>Vibrionaceae</i> em ágar Simidu-Tsukamoto, pela técnica de contagem em profundidade em água e em plâncton, no ágar TCBS pela técnica de contagem em superfície e no ágar TCBS pela técnica de membrana filtrante, coletadas na região costeira do Estado de São Paulo.....	71
Figura 33 - Gráficos Box-plot obtidos das contagens de Bactérias Viáveis Marinhas, Coliformes Termotolerantes e Enterococos Intestinais em amostras de água coletadas em regiões portuárias brasileiras.....	74
Figura 34 - Gráficos Box-Plot obtidos das contagens de membros presuntivos da família <i>Vibrionaceae</i> em amostras de água (a) e plâncton (b) coletadas em regiões portuárias brasileiras.....	75
Figura 35 - Variação dos parâmetros microbiológicos obtidos em amostras de água coletadas em tanques de lastro de navios.....	78
Figura 36 - Gráficos obtidos das análises de correlações positivas entre CV e CT em Santos (SP) (a), CV e CFE em Vitória (ES) (b), CV e CT e CV e CP em Rio Grande (RS) (c e d) em amostras coletadas em tanques de lastro de navios.....	80
Figura 37 - Gráficos Box-Plot obtidos das contagens de membros presuntivos da família <i>Vibrionaceae</i> em amostras de água (a) e plâncton (b) coletadas em tanques de lastro de navios.....	81
Figura 38 - Distribuição dos isolados identificados como presuntivos para o gênero <i>Vibrio</i> spp. por local de coleta da amostra: (a) tanques de lastro de navios; (b) região portuária brasileira; (c) região costeira do Estado de S. Paulo.....	82

Figura 39 - Distribuição das cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. cholerae</i> por local de coleta.....	83
Figura 40 - Gráfico MANOVA gerado pelo programa BIONUMERICS demonstrando a distribuição dos agrupamentos de <i>Vibrio</i> spp. obtidos pela técnica de BOX-PCR conforme o local de coleta.....	85
Figura 41 - Dendograma gerado com a técnica de BOX-PCR de isolados triados como pertencentes ao gênero <i>Vibrio</i> spp. obtidos em amostras coletadas em tanques de lastro de navios, das regiões portuárias brasileiras e região costeira do Estado de São Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.....	86
Figura 42 – Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vp obtidos pela técnica de BOX-PCR conforme o local de coleta.....	87
Figura 43 - Dendograma gerado com a técnica de BOX-PCR de cepas de Vp obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.....	88
Figura 44 - Dendograma gerado com a técnica de BOX-PCR de cepas de Vc obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.....	89
Figura 45 - Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vc obtidos pela técnica de BOX-PCR conforme o local de coleta, de amostras de água de lastro e de água e bivalves de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de São Paulo.....	90
Figura 46 - Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de <i>Vibrio</i> spp. obtidos pela técnica de ERIC-PCR conforme o local de coleta.....	91
Figura 47 - Dendograma gerado com a técnica de ERIC-PCR de cepas <i>Vibrio</i> spp. obtidas em de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.....	92
Figura 48 – Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vp obtidos pela técnica de ERIC-PCR conforme o local de coleta.....	93
Figura 49 – Dendograma gerado com a técnica de ERIC-PCR de cepas de Vp obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.....	94
Figura 50 - Dendograma gerado com a técnica de ERIC-PCR de cepas de Vc obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de São Paulo, com índice de correlação de Pearson	

e 1% de posição de tolerância.....95

Figura 51 - Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vc obtidos pela técnica de ERIC-PCR conforme o local de coleta.....96

Figura 52 – Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de *Vibrio* spp. obtidos pela técnica de REP-PCR conforme o local de coleta.....97

Figura 53 - Dendograma gerado com a técnica de ERIC-PCR de cepas *Vibrio* spp. obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de São Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.....98

Figura 54 - Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vp obtidos pela técnica de REP-PCR conforme o local de coleta, de amostras de tanques de lastro, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo.....99

Figura 55 - Dendograma obtido com a técnica de REP-PCR de cepas de Vp obtidas em amostras de tanques de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.....100

Figura 56 - Dendograma obtido com a técnica de REP-PCR de cepas de Vc obtidas em amostras de tanques de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.....101

Figura 57 - Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vc obtidos pela técnica de REP-PCR conforme o local de coleta.....102

Figura 58 – Dendograma obtido com comparação entre as técnicas de BOX, ERIC e REP-PCR de cepas de *Vibrio* spp. obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo.....103

Figura 59 – Dendograma obtido com comparação entre as técnicas de BOX, ERIC e REP-PCR de cepas de Vp obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo.....105

Figura 60 - Dendograma obtido com comparação entre as técnicas de BOX, ERIC e REP-PCR de cepas de Vc obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de São Paulo.....106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mudanças nos gêneros da família <i>Vibrionaceae</i> desde 1984.....	20
Tabela 2 – Dados de infecções por espécies de vibrios potencialmente patogênicas.....	21
Tabela 3 - Relação dos iniciadores, tamanhos dos amplicons, ciclos e referências utilizadas para as reações de PCR.....	67
Tabela 4 - Valores mínimos, máximos, médias aritméticas, desvio padrão e valores do teste ANOVA dos parâmetros físico-químicos obtidos de amostras de água coletadas na região costeira do Estado de São Paulo.....	69
Tabela 5 - Frequências e medianas das contagens de vibrios nas amostras de água e plâncton da região costeira do Estado de S. Paulo por meio de cultura e método utilizado.....	71
Tabela 6 - Valores mínimos, máximos, médias aritméticas, desvio padrão e valores do teste ANOVA dos parâmetros físico-químicos obtidos de amostras de água coletadas em regiões portuárias brasileiras.....	73
Tabela 7 - Frequência e mediana das contagens de membros presuntivos da família <i>Vibrionaceae</i> obtidas das amostras de água e plâncton coletadas em regiões portuárias brasileiras.....	75
Tabela 8 - Valores mínimos, máximos, médias aritméticas, desvio padrão e valores do teste ANOVA dos parâmetros físico-químicos obtidos de amostras de água coletadas em tanques de lastro de navios.....	77
Tabela 9 – Frequência e valor do quartil superior das contagens de membros presuntivos da família <i>Vibrionaceae</i> obtidas das amostras de água e plâncton coletadas em tanques de lastro de navios.....	79
Tabela 10 - Frequência e média das contagens de membros presuntivos da família <i>Vibrionaceae</i> obtidas em amostras de moluscos bivalves coletadas em regiões portuárias brasileiras e na região costeira do Estado de S. Paulo.....	82
Tabela 11 – Número de isolados submetidos à triagem bioquímica e número de cepas triadas como pertencentes ao gênero <i>Vibrio</i> spp., por tipo de amostra.....	82
Tabela 12 - Total geral de todas as cepas identificadas com <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. cholerae</i> de água, plâncton e bivalves pela técnica de PCR separadas por locais de coleta e tipos de amostra.....	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 ANÁLISE DA LITERATURA.....	3
2.1 Ambiente Costeiro.....	3
2.2 Fatores Climáticos.....	6
2.3 Aquicultura.....	7
2.4 Biodiversidade.....	9
2.5 Gerenciamento costeiro e desenvolvimento sustentável.....	10
2.6 Transporte e regiões portuárias.....	10
2.7 Água de lastro.....	11
2.8 Caracterização de Perigos Microbiológicos e Análises de Riscos no Ambiente Aquático.....	14
2.9 <i>Vibrio</i> spp.	18
2.10 <i>Vibrio cholerae</i>	23
2.11 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	31
2.12 <i>Vibrio vulnificus</i>	35
3 JUSTIFICATIVA.....	39
3.1 Objetivos gerais.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Caracterização das áreas de estudo.....	41
4.1.1 Ambiente costeiro do Estado de São Paulo.....	41
4.1.2 São Sebastião.....	43
4.1.3 Ubatuba.....	44
4.1.4 Santos.....	46
4.2 Regiões portuárias brasileiras.....	46
4.2.1 Porto de Belém (PA).....	48
4.2.2 Porto de Rio Grande (RS).....	50
4.2.3 Porto de Fortaleza (CE).....	51
4.2.4 Porto de Paranaguá (PR).....	53
4.2.5 Porto de Recife (PE).....	54
4.2.6 Porto de Santos (SP).....	58
4.2.7 Porto de Itaguaí (RJ).....	58
4.3 Tanques de Lastro de Navios.....	58
4.4 Amostragem.....	58
4.4.1 Água de regiões portuárias brasileiras e região costeira do Estado de S. Paulo.....	58
4.4.2 Água de tanques de lastro de navios.....	59
4.4.3 Plâncton.....	60
4.4.4 Moluscos Bivalves.....	61
4.5 Análises Microbiológicas.....	61
4.5.1 Contagem de <i>Vibrionaceae</i>	61
4.5.1.1 Processamento das amostras de água do mar e de tanques de lastro.....	62
4.5.1.2 Processamento das amostras de plâncton.....	62
4.5.1.3 Processamento das amostras de moluscos bivalves.....	62
4.5.1.4 Leitura dos resultados.....	62
4.5.1.5 Determinação da qualidade microbiológica das amostras de água.....	62
4.5.1.6 Triagem bioquímica dos isolados presuntivos de vibrios.....	63

4.5.1.7 Identificação das espécies <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i> e de seus fatores associados à virulência pela reação em cadeia pela enzima polimerase.....	63
4.5.1.7.1 Extração de DNA.....	63
4.5.1.7.2 Caracterização das espécies e dos fatores associados à virulência pela reação em cadeia pela enzima polimerase (Polimerase Chain Reaction - PCR).....	64
4.5.1.8 Caracterização molecular pelas técnicas de BOX, ERIC (<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences</i>) e REP-PCR (<i>Repetitive Extragenic Palindromic</i>).....	64
4.5.1.8.1 BOX-PCR.....	64
4.5.1.8.2 ERIC-PCR.....	65
4.5.1.8.3 REP-PCR.....	65
4.5.1.8.4 Eletroforese dos produtos.....	65
4.5.1.9 Análise Estatística.....	68
5 RESULTADOS	69
5.1 Caracterização física, química e microbiológica das áreas estudadas.....	69
5.1.1 Região costeira do Estado de São Paulo.....	69
5.1.2 Regiões portuárias brasileiras.....	72
5.1.3 Tanques de lastro de navios.....	76
5.1.4 Moluscos Bivalves.....	81
5.2 Identificação Bioquímica de Vibrios.....	81
5.3 Identificação pela PCR (Polimerase Chain Reaction) das espécies de <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i> e seus respectivos fatores associados à virulência.....	83
5.4 Tipagem molecular por BOX, ERIC e REP-PCR.....	84
5.4.1 BOX-PCR.....	84
5.4.1.1 <i>Vibrio</i> spp.....	84
5.4.1.2 <i>V. parahaemolyticus</i>	89
5.4.1.3 <i>V. cholerae</i>	90
5.4.2 ERIC-PCR.....	90
5.4.2.1 <i>Vibrio</i> spp.....	93
5.4.2.2 <i>V. parahaemolyticus</i>	95
5.4.2.3 <i>V. cholerae</i>	96
5.4.3 REP-PCR.....	96
5.4.3.1 <i>Vibrio</i> spp.....	99
5.4.3.2 <i>V. parahaemolyticus</i>	101
5.4.3.3 <i>V. cholerae</i>	102
5.5 Comparação entre as técnicas BOX, ERIC e REP-PCR.....	102
5.5.1 <i>Vibrio</i> spp.....	102
5.5.2 <i>V. parahaemolyticus</i>	104
5.5.3 <i>V. cholerae</i>	104
6 Discussão	107
6.1 Região costeira do Estado de São Paulo.....	107
6.2 Regiões portuárias brasileiras.....	113
6.3 Tanques de Lastro de navios.....	120
6.4 Moluscos Bivalves.....	126
6.5 Caracterização molecular.....	128
7 Conclusões	132
Referências Bibliográficas	134
Anexos	163

Anexo 1 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em Santos, região costeira do Estado de S. Paulo.....	164
Anexo 2 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em São Sebastião, região costeira do Estado de S. Paulo.....	165
Anexo 3 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em Ubatuba, região costeira do Estado de S. Paulo.....	166
Anexo 4-8 - Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em regiões portuárias brasileiras.....	167
Anexo 9-14 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em tanques de lastro de navios.....	172
Anexo 15 – Meios utilizados para triagem bioquímica recomendados pelo BAM/FDA (1995).....	178

1 INTRODUÇÃO

A vida na Terra sempre esteve intimamente associada aos oceanos que ocupam 70,8% da superfície terrestre, têm uma média de profundidade de 3.800 m, um volume médio total de cerca de $1.368 \times 10^6 \text{ km}^3$ e corresponde a 90% do volume da biosfera [ANGEL, 1993; GROUP OF EXPERTS ON THE SCIENTIFIC ASPECTS OF MARINE ENVIRONMENTAL PROTECTION (GESAMP), 2001; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP), 2006; UNITED NATIONS (U.N.), 2008]. O ambiente oceânico é definido como a porção de água que se estende desde a plataforma continental até a planície abissal e o ambiente nerítico geralmente compreende a porção de água sobre a costa, que se estende até uma profundidade de 200 metros (Figura 1) (GARIBALDI e LIMONGELLI, 2002). Ele contém as origens evolucionárias da biodiversidade na Terra, com 75% dos maiores táxons de organismos sendo exclusivamente ou primariamente marinhos. Existem cerca de 10^{30} células microbianas no oceano e estas constituem mais de 90% da biomassa de todos os seres vivos nos oceanos (O'DOR, 2003).

Figura 1 – Zonas marinhas.

FONTE: MMA, 2007.

Os microrganismos marinhos são abundantes. Por exemplo, numa gota de água do mar costeira existem mais de 40.000 células de bactéria e arquea. Cerca de 75% da biomassa microbiana é encontrada na camada de 0 a 150 m da coluna de água onde a disponibilidade de

luz permite a fotossíntese. Os 25% restantes são encontrados em águas profundas, sendo que a concentração dos microrganismos diminui gradualmente com o aumento da profundidade. Entretanto, nos sedimentos bênticos podem ser encontradas altas concentrações de microrganismos que participam nos processos geológicos e biológicos em escala global (U. N., 2008).

Os ambientes marinhos e costeiros do Brasil vêm sofrendo nos últimos anos um considerável processo de degradação ambiental, gerado pela crescente pressão sobre os

recursos naturais marinhos e continentais e pela capacidade limitada desses ecossistemas absorverem os impactos resultantes. A introdução de nutrientes, alteração ou destruição de habitats, alterações na sedimentação, superexploração de recursos pesqueiros, poluição industrial, principalmente de poluentes persistentes, e a introdução de espécies exóticas, constituem-se nos maiores impactos ambientais na zona costeira brasileira (GEO BRASIL, 2002).

Os esgotos domésticos são um produto inevitável da atividade antropogênica. A crescente ocupação das regiões costeiras e a formação de grandes centros urbanos costeiros têm resultado na elevação da liberação de nutrientes e outros materiais deletérios contidos, incluindo organismos patogênicos. A perspectiva do crescimento ascendente em densidade demográfica costeira requer o estabelecimento de estratégias adequadas de prevenção, manejo e de redução dos impactos ao meio ambiente e à saúde humana.

Os vibrios fazem parte da microbiota natural, normal ou autóctone do ecossistema marinho e o nosso estudo visa caracterizar a diversidade de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* isolados de amostras de água de mar, plâncton e bivalves da região costeira de S. Paulo, de regiões portuárias brasileiras e de amostras de água e plâncton de tanques de lastro de navios. O presente estudo fornecerá subsídios para caracterizar os perigos relacionados às três espécies estudadas no ambiente marinho.

2 ANÁLISE DA LITERATURA

2.1 Ambiente Costeiro

As águas costeiras (incluindo estuários e lagoas) constituem a interface entre os ambientes marinhos e de água doce, e entre o continente e oceanos (U. N., 2008). Na zona costeira, os sistemas marinhos, terrestres e atmosféricos interagem. Os processos de produção, consumo e troca ocorrem em altas taxas de intensidade. Esta zona inclui as planícies costeiras, a plataforma continental, os estuários que intercedem, as lagoas, as barreiras costeiras e os deltas (RAY, 1991). As áreas costeiras são uma das áreas mais produtivas e biologicamente diversas no planeta (U. N., 2008). A maior parte da população mundial vive em zonas costeiras, e há uma tendência permanente ao aumento da concentração demográfica nessas regiões. Atualmente mais da metade desta população vive dentro numa faixa de 321.870 quilômetros de costa e a expectativa é que a proporção cresça para 75% no ano 2030 (BELAUSTEGUIGOITIA, 2004).

A zona costeira brasileira (Figura 2) compreende uma faixa de 8.689 km de extensão com cerca de 324.000 km² de área, o que corresponde a aproximadamente 4% do território nacional. Abrange uma parte terrestre com 395 municípios e um espaço marítimo com largura de 12 milhas náuticas a partir da linha da costa. Aí vivem quase um quarto da população brasileira, 40 milhões de habitantes, o que corresponde a 120 hab./ km² – cinco vezes mais do que a média nacional. A zona costeira brasileira é composta por significativa diversidade de ambientes, muitos deles extremamente frágeis, com acentuado processo de degradação gerado pela crescente ocupação desse espaço, como por exemplo, os recifes e corais, praias, manguezais e marismas, campos de dunas e falésias, baías, estuários, planícies intermarés, etc [MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA), 2007].

Cinco das nove regiões metropolitanas brasileiras encontram-se à beira-mar: Fortaleza, Recife, Salvador, Rio de Janeiro e ainda Belém, em região estuarina. As atividades econômicas costeiras são responsáveis por cerca de 70% do PIB nacional (GEO BRASIL, 2002).

Figura 2 - Classificação da costa brasileira proposta por Silveira (1964) e modificada por CRUZ *et al.* (1985). Extraído de SOUZA *et al.* 2005.

FONTE: MMA, 2007.

Na zona costeira e marinha encontram-se diversos tipos de vetores de desenvolvimento e pressão como, por exemplo, atividade portuária, petrolífera, química, aquíicultura, pecuária, pesca, agricultura, turismo, desenvolvimento urbano, dentre outras, que associadas ao crescimento populacional ocasionaram mudanças ambientais significativas. Dentre estes vetores, destacam-se a atividade petrolífera e a carcinicultura (cultivo de camarões) como as de crescimento mais significativo nos últimos anos (MMA, 2007).

Outras atividades como o turismo, quando realizado de forma desordenada, podem interferir negativamente na qualidade do ambiente, com conseqüências diretas na qualidade

de vida das populações residentes nestas áreas. Questões como segunda residência, demanda por infra-estrutura logística e de saneamento, entre outras, fazem parte das pressões incidentes neste espaço geográfico (MMA, 2007). A saúde, o bem-estar e, em alguns casos, a própria sobrevivência das populações costeiras dependem da saúde e das condições dos sistemas costeiros, incluídas as áreas úmidas e regiões estuarinas, assim como as correspondentes bacias de recepção e drenagem e as águas interiores próximas à costa, bem como o próprio sistema marinho. Em síntese, a sustentabilidade das atividades humanas nas zonas costeiras depende de um meio marinho saudável e vice-versa (GEO BRASIL, 2002).

O impacto econômico global da contaminação do ambiente marinho, do consumo de frutos do mar ou seu uso recreacional, em termos de enfermidades humanas, saúde debilitada e perda de qualidade de vida, pode ser de aproximadamente US\$ 13 bilhões (U. N., 2008). Segundo resultados do Gerco (Gerenciamento Costeiro- MMA), o litoral brasileiro recebe mais de 3.000 toneladas de poluentes líquidos por dia. Os resultados preliminares indicam que os despejos poluidores são constituídos principalmente de efluentes industriais e esgotos domésticos (GEO BRASIL, 2002).

A maioria das doenças emergentes não é ocasionada por novos microrganismos, mas por agentes já conhecidos infectando hospedeiros novos ou não-usuais. Um surto é favorecido por mudanças nas condições ambientais que tanto pode aumentar a prevalência de uma doença existente quanto favorecer uma nova doença, entretanto é sempre difícil identificar uma causa específica. Duas condições, variabilidade climática e atividade antropogênica crônica, parecem ter envolvimento em epidemias, pela diminuição da resistência do hospedeiro e pelo favorecimento na transmissão de determinados patógenos (GRIMES, 1991; HARVELL *et al.*, 1999).

A globalização da cadeia alimentar tem levado a uma rápida distribuição e disseminação dos alimentos. Os patógenos podem ser introduzidos inadvertidamente em novas áreas geográficas, assim como ocorreu com o deslastre de água de lastro contaminada com *Vibrio cholerae* O1 toxigênico em 1991 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007a).

Doenças infecciosas e de veiculação hídrica são a maior causa de morbidade e mortalidade mundialmente (WHO, 2003a). Atualmente 1,1 bilhões de pessoas não têm acesso à água potável e 2,6 bilhões de pessoas, ou mais de 40% da população mundial, não têm condições sanitárias adequadas. Como resultado, mais de 4500 crianças abaixo dos 5 anos de idade morrem todos os dias de doenças facilmente previsíveis como a diarreia (U. N., 2006; WHO, 2007a). No Brasil, no ano de 1999, as doenças relacionadas ao saneamento ambiental

inadequado representaram 29,5% dos óbitos por doenças infecciosas e parasitárias, sendo estas proporções maiores nas regiões Nordeste (46,5%) e Centro-Oeste (46,3%). A maior parte destes óbitos está relacionada às diarreias, principalmente entre menores de 5 anos, mesmo considerando que esses números estão subestimados pelos problemas de notificação em alguns estados brasileiros (COSTA *et al.*, 2001; GEO BRASIL, 2002).

2.2 Fatores climáticos

As distribuições geográficas e sazonais de muitas doenças infecciosas estão relacionadas ao clima, conseqüentemente, a possibilidade do uso das previsões da sazonalidade climática como indicador preditivo em sistemas de alerta iniciais (EWS - Early Warning Systems) têm sido de grande interesse (WHO, 2004). As variáveis climáticas, principalmente precipitação e temperatura, estão relacionadas às doenças de veiculação hídrica e alimentar e aos problemas na qualidade das águas costeiras (ROSE *et al.*, 2001).

De significância particular é o fenômeno de oscilação sudeste El Niño (ENSO), um ciclo climático global de ocorrência natural que envolve interações complexas entre a superfície do oceano e a atmosfera no Pacífico tropical (U. N., 2008).

Globalmente, a doença entérica de veiculação hídrica que mais tende a aumentar devido às mudanças climáticas globais é a cólera, que ainda é uma causa importante de mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento (COLWELL, 1996; GREER *et al.*, 2008). Epidemias regionais ocorrem sazonalmente e estão associadas com períodos de chuvas excessivas, temperaturas altas e aumento nas populações de plâncton (WHO, 2004). O padrão climático global “El Niño” tem sido responsabilizado por trazer novos surtos de cólera em cada ciclo de aquecimento da água, devido à penetração dos nutrientes nos sistemas estuarinos e costeiros durante as grandes chuvas, sempre acarretando em florescência de plâncton (KOELLE *et al.*, 2005; HARVELL *et al.*, 1999). O agente causador da cólera está associado ao plâncton marinho (HARVELL *et al.*, 1999), entretanto cepas não-toxigênicas de *V. cholerae* e outros vibrios não-coléricos (por exemplo, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) também podem ser tornar agentes mais freqüentes de doenças, como resultado do aumento da temperatura do oceano e aumento na freqüência de eventos climáticos extremos. Um exemplo recente de grande repercussão foram os casos de doenças devidos a estes microrganismos que ocorreram em associação ao furacão Katrina em 2005 [GREER *et al.*, 2008; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2005].

As mudanças climáticas podem aumentar os riscos de doenças infecciosas através da expansão do número de espécies que transportam doenças zoonóticas, mudança na dinâmica dos patógenos em seus reservatórios ambientais e alteração nos ciclos de transmissão dos patógenos. A migração provocada por períodos de secas ou enchentes pode aumentar a transmissão de muitas doenças devido ao aumento do contato entre as populações que antes estavam isoladas umas das outras. Grandes migrações têm sido associadas a surtos de doenças e à emergência de novas infecções ao longo dos registros históricos (GREER *et al.*, 2008).

2.3 Aqüicultura

A aqüicultura mundial tem crescido tremendamente durante os últimos cinquenta anos pulando de uma produção de menos de um milhão de toneladas no começo dos anos cinquenta para 59.4 milhões de toneladas em 2004 (FAO, 2006).

Frutos do mar, principalmente moluscos normalmente ingeridos crus, são um veículo de transmissão comumente implicados na transmissão de doenças infecciosas causadas por microrganismos entéricos (incluindo bactérias e vírus) que entram no ambiente marinho através do despejo de dejetos urbano-domésticos (U. N., 2008). Têm sido estimado que anualmente a população mundial consoma cerca de 800 milhões de refeições de mariscos e outros frutos do mar potencialmente contaminados coletados ou cultivados em áreas costeiras poluídas (SHUVAL, 2003).

No Brasil, a produção nacional de mexilhões em 2000, foi de 2.500 t e 1,3 milhões de dúzias de ostras. No caso específico de mexilhões, a produção nacional oriunda do cultivo em 1990 era de apenas 120 t, sendo hoje o Brasil o maior produtor das Américas. A situação do Estado de Santa Catarina é a que melhor representa o setor: existem 1.050 malacocultores, organizados em 18 associações e 4 cooperativas, destacando-se o cultivo de moluscos, sendo este responsável por cerca de 93% da produção nacional, com uma produção de 11.364 t de mexilhão e 1.592 t de ostras. (PROENÇA, 1999). No ano de 2000, a mitilicultura catarinense movimentou em torno de 6 milhões de dólares e gerou mais de 5.000 empregos diretos (MANZONI, 2005). Os outros estados produtores são Paraná, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Sergipe, Bahia, Pernambuco e Pará [SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA/PARANÁ (SEAP/PR), 2004] (Figura 3).

Em 2003 foram produzidos 10.807 toneladas de moluscos, sendo 2.196 toneladas de ostras, havendo um aumento de 42% em relação ao ano de 2002 (RISTORI *et al.*, 2007).

Figura 3 - Síntese da atividade de maricultura no Brasil, quanto à produção de camarão e moluscos.

FONTE: IBAMA (MMA, 2007).

No Brasil, as principais espécies de cultivo de moluscos são as ostras, comumente consumidas *in natura* com algumas gotas de limão, e os mexilhões, consumidos após levemente cozidos. Muitas enfermidades são transmitidas ao homem por diversos microrganismos, através da ingestão de moluscos bivalves marinhos não submetidos ao cozimento ou insuficientemente cozidos. Essa contaminação pode ocorrer diretamente através da água, ou indiretamente no consumo de produtos *in natura* contaminados durante os processos de manipulação, armazenamento, transporte ou preparação para o consumo (PEREIRA, 2003). O cultivo e/ou extração de moluscos representa, dessa maneira, uma prática de comércio realizada na maior parte das vezes por determinadas populações que habitam regiões próximas ao mar e que dele retiram seu meio de subsistência, sendo a captura e o processamento sem os devidos cuidados sanitários, por falta de conhecimento ou

consciência das mesmas. Muitas vezes, os métodos utilizados são rudimentares e os mexilhões são expostos às ações dos ventos, chuva e sol, sem a preocupação com a higiene e proporcionando risco de contaminação (PEREIRA, 2003). No sistema atual de comercialização e distribuição dos moluscos, prevalece ainda a venda do produto *in natura* ou desconchado, nas proporções de 30% a 70%, respectivamente. Do desconchado, metade é vendida a granel e os outros 50% são embalados em sacos plásticos (PACHECO, 2004).

Os problemas à saúde humana associados aos moluscos bivalves são reconhecidos internacionalmente. Ecossistemas aquáticos submetidos à poluição ou contaminação podem trazer sérios problemas de saúde aos seres humanos. Existem riscos de diversas doenças provocadas por parasitas, biotoxinas e intoxicações químicas (metais pesados, agrotóxicos) e por microrganismos. As toxinfecções alimentares de origem bacteriana representam a consequência mais comum relacionada ao consumo de moluscos bivalves provenientes de áreas poluídas (PEREIRA, 2003; POTASMAN *et al.*, 2002).

2.4 Biodiversidade

A biodiversidade aquática é extremamente rica, com altos níveis de espécies endêmicas e é muito sensível a degradação e ao excesso de exploração (U. N., 2006). Muitos organismos potencialmente patogênicos, incluindo *Aeromonas*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, e *Vibrio*, são naturalmente ativos em estuários e oceanos (GRIMES, 1991); sendo que alguns podem persistir em estado “dormente” não-cultivável, porém viáveis (COLWELL, 1985).

A conservação da biodiversidade (espécies, funções dos habitats e ecossistemas) precisa se tornar parte integral de todos os programas de monitoramento e gerenciamento dos recursos hídricos. Isto ajudará na sustentabilidade dos ecossistemas aquáticos para futuras gerações (U. N., 2006).

A biodiversidade e conservação dos ecossistemas de águas doces e costeiras não são objetos separados da sustentabilidade de água limpa e segurança alimentar, mas parte integral de um mesmo programa. Entretanto, dados sobre a biodiversidade e qualidade da água existem somente para alguns grupos de espécies, habitats e regiões, existindo ainda grandes “falhas” na informação disponível em muitas espécies, e muito pouca informação está disponível sobre a extensão e qualidade dos ecossistemas aquáticos (U. N., 2006).

2.5 Gerenciamento costeiro e desenvolvimento sustentável

O gerenciamento costeiro é amparado pela Constituição Federal no Brasil, que define a zona costeira como propriedade nacional. O Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro (PNGC) (Lei nº 7661, 1998) e o Programa Nacional de Gerenciamento Costeiro incluem todos os 17 estados costeiros e seus municípios ao longo da costa Atlântica Brasileira (MARQUES *et al.*, 2004a).

Os objetivos principais em qualquer avaliação da saúde ambiental marinha numa escala global ou regional são fornecer informações necessárias para assegurar a manutenção da biodiversidade e integridade das comunidades, minimizando a perda de espécies, limitando a influência humana ou os recursos vivos (incluindo diversidade genética), proteger habitats críticos e assegurar a saúde humana. Todos esses objetivos são vitais para assegurar o desenvolvimento sustentável dos recursos marinhos e costeiros (U. N., 2008).

Um dos instrumentos globais para o gerenciamento do risco da disseminação de doenças são os regulamentos do “International Health Regulations” (IHR), cujo propósito é prevenir a disseminação de doenças entre as fronteiras internacionais. Eles são um instrumento vital legislativo de segurança da saúde pública, providenciando a estrutura global necessária para prevenir, detectar, avaliar e, se necessário, providenciar uma resposta coordenada a eventos que podem constituir uma emergência na saúde pública de âmbito internacional (WHO, 2007).

No Brasil o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) criou a resolução nº274/2000, visando garantir a qualidade bacteriológica de águas de recreação.

2.6 Transporte e regiões portuárias

A atividade portuária é considerada pela legislação ambiental como potencialmente poluidora, tendo em vista os resíduos provocados tanto pelo porto como pelas embarcações. Localizados próximos à foz dos rios ou em baías e enseadas, os portos recebem por intermédios dos rios e córregos, resíduos provenientes das atividades agropecuárias, indústrias, de mineração, do turismo, a ocupação desordenada do solo, do desmatamento, de obras na costa e aterros, que somados contribuem para a poluição no entorno do porto, tanto em terra como nas águas. Cerca de 98% do comércio exterior brasileiro circula por meio de nossos portos, movimentando recursos de aproximadamente US\$ 100 bilhões por ano (AGÊNCIA NACIONAL DE TRANSPORTES AQUAVIÁRIOS, 2008).

De acordo com a Diretoria de Portos e Costas Marinhas do Brasil, os portos brasileiros movimentam um total de 400 milhões de toneladas por ano, o que representa 40 milhões de água de lastro descarregada todos os anos nas águas costeiras brasileiras. No ano de 2007 a movimentação total de cargas nos portos/terminais brasileiros foi de 754.716.655t (ANTAQ, 2008). A maioria dos portos brasileiros não tem infra-estrutura adequada do ponto de vista ambiental, para o gerenciamento de resíduos gerados pelas atividades das docas, não têm plano de contingência para acidentes ou expansão e modernização dos portos. Atualmente, existem 33 portos que potencialmente podem gerar impactos no litoral devido à intensa atividade nas docas, e podem representar riscos de despejos tanto nas áreas costeiras quanto nos oceanos (MARQUES *et al.*, 2004b).

Os portos com maior tráfego de embarcações em 2007 foram Santos-SP, Rio Grande-RS e Paranaguá-PR com 16,7%, 11,5% e 7,4% do total de atracações ocorridas no país, respectivamente (ANTAQ, 2008).

2.7 Água de Lastro

O primeiro transporte aquático foi provavelmente nada mais que uma barquilha usada para cruzar um córrego. Esta viagem pode ter sido feita durante a Idade do Gelo ou muito antes quando nossos ancestrais de hominídeos se dispersaram da África. Durante o período histórico datado de antes de 5.000 a.C., os navios já eram usados. As primeiras ilustrações de navios vêm do Egito. Parece obvio dizer hoje em dia que vivemos num mundo global, e é certamente verdade que o comércio internacional entre as nações e regiões do mundo não é nada novo. Desde os fenícios até os egípcios, os gregos e os cartagianos, os chineses e vikings, os portugueses, italianos, britânicos, franceses, os polinésios e celtas, a história do mundo é a história da exploração, conquista e comércio pelo mar (U. N., 2008).

Respondendo hoje por cerca de 80% do comércio mundial, o transporte marítimo internacional vem contribuindo para a eliminação ou redução das barreiras naturais que sempre separaram e mantiveram a integridade dos ecossistemas, aumentando a homogeneização da flora e fauna em todo o mundo (SILVA *et al.*, 2004). A primeira menção à introdução de organismos exóticos via água de lastro, foi feita por Ostensfeld (1908) depois da ocorrência de uma floração da alga diatômacea *Odontella sinensis* no Mar do Norte, endêmica da costa tropical e subtropical do Indo-Pacífico. Somente 70 anos mais tarde, um navio foi estudado com amostragem de água de lastro (SILVA *et al.*, 2004).

Segundo estimativas ocorre a transferência de aproximadamente 3 a 5 bilhões de toneladas de água de lastro internacionalmente a cada ano. Volumes similares também têm sido transferidos domesticamente dentro de cidades e regiões anualmente. A água de lastro é absolutamente essencial para operações seguras e eficientes de navios modernos, providenciando balanço e estabilidade a navios sem carga (figura 4). Entretanto, ela representa um sério problema do ponto de vista ecológico, econômico e para a saúde [INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION (IMO), 2008].

Figura 4 – Vista do corte através de um navio mostrando os tanques de lastro e o ciclo da água de lastro. (1) coleta inicial da água de lastro no ponto de origem; (2) tanque de lastro cheio durante a viagem; (3) descarga da água de lastro no ponto de chegada; (4) tanques de lastro ocupados com carga durante viagem.

FONTE: IMO, 2008.

Todos os dias, cerca de 7000 espécies de organismos são transportados ao redor do mundo via água de lastro. Ruiz *et al.* (1998) indicaram que uma média de 90% dos navios transportam organismos vivos na sua água de lastro. A grande maioria das espécies marinhas transportadas pela água de lastro não sobrevive ao percurso e ao ciclo de lastro e deslastro,

sendo estes tanques extremamente hostis à sobrevivência dos organismos. Mesmo para aqueles que sobrevivem ao percurso e são liberados, as chances de sobrevivência nas novas condições ambientais, incluindo predação e/ou competição com as espécies nativas, são reduzidas. Entretanto, quando todos os fatores são favoráveis, uma espécie introduzida que sobrevive e se reproduz num ambiente hospedeiro, pode se tornar invasiva, competir com espécies nativas e se multiplicar em proporções desastrosas (IMO, 2008).

As espécies não nativas que se estabelecem em um novo ambiente são denominadas bioinvasoras, pois conseguem se adaptar às novas condições, podendo causar desequilíbrio ecológico e o desenvolvimento de doenças no local onde foram introduzidas. Estes novos organismos podem causar mudanças nas estruturas e funcionamento dos ecossistemas, como alterações na cadeia alimentar, competição por alimento e por espaço, podendo até eliminar as espécies nativas daquela região. Outra consequência está relacionada com o cruzamento da espécie invasora com a espécie nativa promovendo alterações no “pool” genético da população já existente. Um exemplo bem conhecido de organismo introduzido por meio da água de lastro na América do Norte, é o do molusco mexilhão zebra, da espécie *Dreissena polymorpha*, que causou um grande impacto ambiental e alto prejuízo econômico (RIGBY *et al.*, 1999). Os microrganismos possuem uma grande capacidade de invadir novos ambientes. Bactérias e vírus são numericamente dominantes na água do mar, sendo muito mais abundantes que os macrorganismos (DRAKE *et al.*, 2002). Ainda, muito microrganismos possuem estratégias de sobrevivência como a formação de cistos (HALLEGRAEFF e BOLCH, 1991, 1992) e habilidade de se submeterem a mudanças morfológicas (WAI *et al.*, 1999), que os tornam capazes de se manterem viáveis durante períodos prolongados em condições inóspitas, como as que ocorrem em tanques de água de lastro (DRAKE *et al.*, 2002).

Diversos regulamentos nacionais e internacionais foram implementados visando diminuir os riscos da transferência de organismos exóticos. Austrália e Canadá introduziram em 2001 normas obrigatórias e em 2004 tornou-se obrigatório pela guarda costeira dos Estados Unidos o gerenciamento da água de lastro. Estas advertências culminaram em 2004, com a adoção de normas pela Organização Internacional Marítima (IMO) através da Convenção para o Controle e Gerenciamento da Água de Lastro e Sedimentos, que descreveu procedimentos padrões estritos para a troca da água de lastro e processos de tratamento (HALLEGRAEFF, 2007). Os indicadores microbiológicos adotados na Convenção foram: (i) *V. cholerae* O1 ou O139 toxigênico <1 UFC/100 mL ou <1 UFC/grama (peso úmido em amostras de zooplâncton); (ii) *E. coli* < 250 UFC/100 mL; (iii) Enterococos fecais <100

UFC/100 mL. Para entrar em vigor, a Convenção deverá ser ratificada por pelo menos 30 países, que representem 35% da tonelagem da frota mundial (IMO, 2004).

A questão de como gerenciar os riscos devido a organismos aquáticos prejudiciais contidos na água de lastro dos navios é um dos desafios mais problemáticos da atualidade na indústria marítima. Os riscos ecológicos envolvidos são incertos e difíceis de avaliar. Vários métodos para o controle destes riscos têm sido propostos, mas os custos e a efetividade são ainda desconhecidos. O único método conhecido em amplo uso para reduzir a disseminação de espécies não nativas via descarga de água de lastro é a troca da água de lastro em oceano aberto, que teoricamente reduziria a probabilidade de sobrevivência destas espécies devido às diferentes condições de temperatura e salinidade entre oceanos e regiões costeiras das quais estas se originam (SMITH *et al.*, 1999).

No Brasil, a invasão mais conhecida proporcionada pela água de lastro refere-se ao mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei*, um molusco bivalve originário dos rios asiáticos, em especial da China. Esses moluscos são encontrados, geralmente, fixados a substratos duros, naturais ou artificiais. Esse organismo de água doce foi introduzido no Rio da Prata, Argentina, em 1991 (PASTORINO *et al.*, 1993), avançando pelos rios Paraná e Paraguai (DARRIGRAN, 1997) e chegou ao Pantanal brasileiro (SILVA *et al.*, 2002). A invasão silenciosa do mexilhão dourado provocou impactos sócio-econômicos significativos para a economia e parte da população, uma vez que entope os filtros protetores das companhias de abastecimento de água potável, exigindo manutenções mais frequentes; impedem o funcionamento normal das turbinas da Usina de Itaipu, com prejuízos de quase US\$ 1 milhão a cada dia de paralisação desnecessária do sistema; forçam mudanças nas práticas de pesca das populações e prejudicam o sistema de refrigeração de pequenas embarcações, fundindo motores (JURAS, 2003).

A possibilidade da água de lastro causar males foi reconhecida não apenas pela Organização Marítima Internacional, mas também pela Organização Mundial de Saúde, que está preocupada com o papel desempenhado por esta como meio propagador de bactérias causadoras de doenças epidêmicas (IMO, 2008).

2.8 Caracterização de Perigos Microbiológicos e Análises de Riscos no Ambiente Aquático.

A avaliação dos impactos da qualidade da água na saúde é uma ferramenta importante no desenvolvimento de políticas apropriadas. As ferramentas de avaliação de riscos estão sendo cada vez mais utilizadas como ferramenta científica adequada para o gerenciamento de

riscos (POND, 2005). A água funciona tanto como um ingrediente na alimentação quanto um veículo independente de exposição aos perigos microbiológicos através do seu consumo, atividades recreacionais ou contato com aerossóis [FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO), 2003].

O processo de “análise de risco” é constituído por três partes separadas, mas integradas entre si, denominadas avaliação do risco, gerenciamento do risco e comunicação do risco (figura 5). O processo de análise de riscos precisa ser aberto e em cada passo todas as partes interessadas devem ser permitidas de participar e comentar (HUSS *et al.*, 2003).

A avaliação de risco fornece a base científica para a análise de risco [CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION (CFSAN)/ FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2000] e consiste de quatro passos principais: (1) identificação do perigo, que envolve a identificação dos efeitos adversos potenciais ou conhecidos associados com um agente particular; (2) caracterização do perigo, que envolve avaliação quantitativa/qualitativa da natureza dos efeitos adversos associados com agentes biológicos ou químicos que podem estar presentes, onde uma avaliação da dose-resposta deve ser feita se dados forem disponíveis; (3) avaliação da exposição, que implica na avaliação quantitativa/qualitativa do grau de entrada que estes possam ocorrer; (4) caracterização do risco, onde a integração dos três passos anteriores pode fornecer dados para estimar os efeitos adversos que possam ocorrer numa dada população levando em conta diversas variantes.

Figura 5 – Componentes genéricos da Análise de Riscos.

FONTE: FAO/WHO, 2006.

A avaliação de risco utiliza modelos quantitativos, que é um processo matemático utilizado para avaliar as chances de ocorrência de efeitos adversos depois da exposição a microrganismos patogênicos. O risco é expresso como uma equação matemática da chance de doença ou morte depois da exposição a determinados patógenos e representa as probabilidades acumuladas da ocorrência de certos eventos e a incerteza associada a estes (CFSAN/ FDA, 2000).

Análise quantitativa dos riscos microbiológicos (Quantitative Microbial Risk Assessment – QMRA) é utilizada para estimar a probabilidade de infecção por um patógeno específico depois de uma exposição. QMRA utiliza as densidades de patógenos específicos, assumindo taxas de ingestão e modelos apropriados de dose-resposta para estimar o nível do risco em determinada população exposta. QMRA e estudos epidemiológicos fornecem informações complementares e devem ser utilizados juntos para melhor obtenção de estimativas de riscos (POND, 2005). O processo de QMRA produz uma estimativa estatística dos efeitos adversos associados à exposição a determinados perigos (HAAS *et al.*, 1999).

O processo de análise de risco normalmente começa com o passo de gerenciamento do risco para definir o problema, articular os objetivos da análise de risco e identificar questões a serem solucionadas pela avaliação de risco se, e quando isto for necessário. Durante a fase de avaliação do risco as fases de “medição” e “descrição” da natureza do risco a ser analisado são executadas mediante ferramentas de base científica. O processo de análise de risco sempre culmina com a implantação de medidas de redução dos riscos e monitoramento contínuo de sua efetividade pelos governos, setores privados e outras partes interessadas (FAO/WHO, 2006).

Avaliação da exposição caracteriza a porção do perigo que é consumida pelos diversos membros de uma população exposta. A caracterização da exposição envolve a interação entre patógeno, ambiente e a população envolvida, sendo três elementos essenciais: a caracterização do patógeno, sua ocorrência e a análise da exposição. O ponto final desta caracterização está no desenvolvimento de um perfil de exposição que quantitativamente ou qualitativamente avalia a magnitude, frequência e os padrões de exposição humana ao cenário desenvolvido durante a formulação do problema e serve como uma contribuição na caracterização de risco (FAO/WHO, 2006).

Perigo é um conjunto de circunstâncias que podem levar a um dano. A existência de diversos perigos num ambiente de águas recreacionais, como perigos físicos, contaminação da água, contaminação da areia da praia, algas e seus produtos tóxicos, agentes químicos e

físicos e organismos aquáticos perigosos indicam a necessidade de um entendimento na sua importância relativa para a saúde e as implicações para o controle. O risco da ocorrência de danos é definido como a probabilidade que este irá ocorrer como resultado da exposição a uma determinada quantidade do perigo. Estudos epidemiológicos são ferramentas essenciais por providenciarem estimativas do risco e dados para os modelos de análise de riscos (FAO/WHO, 2005). Uma ampla faixa de características do perigo (por exemplo, infectividade, virulência, resistência a antibióticos), e de características do hospedeiro (por exemplo, suscetibilidade fisiológica, estado imune, história prévia de exposição, doenças conjuntas) afeta a caracterização do perigo e sua variabilidade associada (FAO/WHO, 2006).

O início de uma caracterização do perigo requer um estágio sistemático de planejamento para identificar o contexto, o propósito, a possibilidade e o foco do estudo a ser iniciado. Devem ser considerados os aspectos do patógeno, hospedeiro e da matriz (FAO/WHO, 2003). Em relação aos microrganismos os principais fatores a serem considerados são: capacidade de replicação; virulência e infectividade que podem mudar dependendo de sua interação com o hospedeiro e o ambiente; transferência genética, levando a transferência de características como fatores de virulência e resistência a antibióticos; disseminação por vias secundárias e terciárias; existência de portadores sadios e em alguns casos baixas doses do microrganismo podem causar um efeito severo (FAO/WHO, 2003).

Em relação ao hospedeiro os fatores importantes são os genéticos, idade, estado nutricional, estado imune, infecções prévias; característica da população como acesso e uso de medicamentos, e persistência do organismo na população (FAO/WHO, 2003).

O número, tamanho e natureza das amostras coletadas para análise influenciam fortemente os resultados (figura 6). Em alguns casos é possível para a amostra analítica ser verdadeiramente representativa do lote amostrado. Isto se aplica a líquidos como leite e água. Entretanto isto não se aplica em casos de vários lotes ou grupos de alimentos, pois um lote de alimentos pode consistir de unidades com amplas diferenças em termos de qualidade microbiológica. Mesmo dentro de uma unidade (por exemplo, um pacote) o perigo pode estar desigualmente distribuído e provavelmente a detecção será muito baixa (HUSS *et al.*, 2003).

Caracterização do risco envolve as estimativas quantitativas e/ou qualitativas, incluindo as incertezas encontradas, da probabilidade de ocorrência e severidade dos efeitos adversos conhecidos ou potenciais numa dada população baseado na identificação do perigo, caracterização do perigo e avaliação da exposição (FAO/WHO, 2006).

Figura 6– Diagrama de fluxo genérico para fontes de riscos microbiológicos no contexto de água de consumo.

FONTE: FAO/WHO, 2006.

Gerenciamento de risco é um processo distinto da avaliação de risco, com alternativas de peso político em consulta com todas as partes interessadas, considerando a avaliação de risco e outros fatores relevantes para proteção da saúde e promoção de práticas justas de comércio, e se necessário a seleção de opções apropriadas de prevenção e controle (FAO/WHO, 2006).

E finalmente, a comunicação do risco é a troca interativa de informações e opções através do processo de análise de risco relacionadas ao risco, seus fatores e percepções, entre os assessores, gerenciadores, consumidores, setores acadêmicos e demais partes interessadas, incluindo os detalhes dos achados da avaliação de risco e as bases das decisões do gerenciamento de riscos. Uma comunicação de risco eficiente é um pré-requisito para um gerenciamento e avaliação de riscos efetivos (FAO/WHO, 2006).

2.9 *Vibrio spp.*

A família *Vibrionaceae*, primeiramente descrita por Verón (1965), é um grupo de bactérias altamente divergentes, que contém tanto espécies de vida livre como simbióticas, sendo um dos mais bem estudados grupos de bactérias heterotróficas nos ecossistemas marinhos (NISHIGUCHI e JONES, 2004). Membros desta família são globalmente

importantes devido sua prevalência em numerosos nichos ecológicos (NISHIGUCHI e NAIR, 2003). Tem sido demonstrado, através de experimentos, que membros da família *Vibrionaceae* estão distribuídos através da coluna d'água no mar aberto (RADJASA *et al.*, 2001). Entretanto, a composição das espécies pode variar com a profundidade (RUBY *et al.*, 1980). Eles desempenham papéis importantes nas águas de superfície e habitam diversos nichos ecológicos, incluindo trato intestinal de peixes (SIMIDU *et al.*, 1977), peixes e lulas luminescentes (RUBY e NEALSON 1976; MCFALL-NGAI, 2000) e são encontrados como ectosimbiontes de crustáceos (ROSZAK e COLWELL, 1987). Devido sua ampla distribuição ecológica e importância na estrutura da comunidade marinha, sua identificação taxonômica tem sido extensivamente estudada (NISHIGUCHI e JONES, 2004). No ambiente marinho as espécies podem ser encontradas em fontes hidrotermais (RAGUENES *et al.*, 1997), mar profundo (MARUYAMA *et al.*, 2000), mar aberto (EILERS *et al.*, 2000), estuários e sedimentos marinhos (LEE e RUBY, 1994).

Tradicionalmente, acreditava-se que membros da família *Vibrionaceae* compreendiam uma grande porção das comunidades bacterioplancônicas (ZOBELL, 1946). Entretanto técnicas moleculares modernas (como hibridação fluorescente *in situ*) têm demonstrado que estes dados estavam superestimados (EILERS *et al.*, 2000). As estimativas mais recentes mostram variação de 1 (EILERS *et al.*, 2000) a 10 (NISHIMURA *et al.*, 1995) por cento das células totais, dependendo do habitat. Apesar de compreenderem somente uma pequena porcentagem das bactérias totais de vida livre no ambiente marinho, a importância dos vibrios não pode ser subestimada (NISHIGUCHI e JONES, 2004).

Vibrionaceae é uma das 22 famílias dentro das 14 ordens do γ -Proteobacteria, umas das cinco subdivisões no filo *Proteobacteria* dentro do domínio *Bacteria*. Membros desta família foram primeiramente descritos como bactérias oxidase-positivas, móveis com flagelo polar (KRIEG & HOLT, 1984). Dados mais recentes demonstraram que todas as espécies da família *Vibrionaceae* são bacilos curvos ou retos, com algumas espécies oxidase-negativas (*Vibrio metschnikovii*, *V. gasogenes*, *Photobacterium phosphoreum*, *P. angustum*, e algumas cepas de *P. leiognathi*), e algumas sendo não-móveis (NISHIGUCHI e JONES, 2004).

Com o advento da reação em cadeia pela enzima polimerase (PCR) e o sequenciamento do DNA no meio dos anos 80 houve uma série de reorganizações dentro da família *Vibrionaceae* (tabela 1), entretanto é interessante observar que dentro destas mudanças nestes 16 anos, somente *Vibrio* e *Photobacterium* não foram excluídos desta família (NISHIGUCHI e JONES, 2004).

Tabela 1 – Mudanças nos gêneros da família *Vibrionaceae* desde 1984. Números em parênteses indicam o número total de espécies descritas naquele gênero.

1984	Família Atual	Julho 2002	Dados adicionados
<i>Vibrio</i> (20)	Sem mudanças	<i>Vibrio</i> (72)	-----
<i>Photobacterium</i> (3)	Sem mudanças	<i>Photobacterium</i> (7)	-----
<i>Aeromonas</i> (4)	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Allomonas</i> (1)	Kalina <i>et al.</i> (1984)
<i>Pleisomonas</i> (1)	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enhydrobacter</i> (1)	Staley <i>et al.</i> (1987)
		<i>Listonella</i> (3)	MacDonell e Colwell (1985)
		<i>Salinivibrio</i> (1)	Mellado <i>et al.</i> (1996)

FONTE: NISHIGUCHI e JONES, 2004.

A família *Vibrionaceae* contém seis gêneros: *Vibrio*, *Allomonas*, *Enhydrobacter*, *Listonella*, *Photobacterium* e *Salinivibrio*. Cada gênero tem suas próprias características morfológicas e fisiológicas distintas (KRIEG e HOLT, 1984). Os dados fenotípicos usados para definir cada gênero são o conteúdo G/C, a presença de flagelo polar com bainha, necessidade de sódio para crescimento, atividade de lipase, utilização de D-manitol, e sensibilidade ao composto vibriostático 0/129 (HOLT *et al.* 1994). Estes anaeróbios facultativos têm conteúdo G/C na faixa de 38-66% (KRIEG e HOLT, 1984).

O nome *Vibrio* vem da palavra latina *Vibrare*, que significa “vibrar”. Otto Müller usou primeiro a palavra *Vibrio* no século 18 para descrever bactérias com formas alongadas observadas em cultura (ROSSELLO-MORA e AMANN, 2001).

O gênero *Vibrio* é o maior dentro da família *Vibrionaceae*, compreendendo 81 espécies, das quais, 13 (Tabela 2) podem causar doenças em humanos, incluindo infecção em feridas septicemia e gastroenterite (FAO/WHO, 2001). As diferentes espécies encontradas dentro do gênero *Vibrio* podem ter diferentes nichos ecológicos (THOMPSON *et al.*, 2007), mas em geral são tipicamente de ambientes estuarinos ou/e marinhos, sendo necessária a compreensão profunda destes sistemas ecológicos para se entender sua ecologia global (COLWELL, 2006). A maioria das espécies necessita de NaCl (2-3%) para crescer. Devido ao fato do ambiente aquático marinho ser seu nicho natural, estes microrganismos são comumente isolados de peixes e crustáceos. A maioria das espécies é mesófila e seus números aumentam durante estações do ano quentes.

Os vibrios têm desempenhado um papel importante na história da humanidade. Surto de cólera, causados pelo *Vibrio cholerae* podem ser rastreados no tempo através de descrições remotas de infecções entéricas registradas (COLWELL, 2006). Os estudos ecológicos de

vibrios começaram no início dos anos 60. Em 1977 *V. cholerae* foi cultivado em amostras de água obtidas da parte superior e média da Baía Chesapeake nos Estados Unidos no final do outono e início da primavera (JOSEPH *et al.*, 1982). Estuários similares ao redor do mundo têm provado também serem reservatórios para *V. cholerae* (COLWELL, 2006).

Membros do gênero *Vibrio* são capazes de proliferar com sucesso em áreas com grande disponibilidade de substrato e densidade celular (por exemplo, biofilmes), assim como persistir como células pelágicas de vida livre. Vibrios têm sido encontrados associados com organismos superiores e com superfícies inanimadas (MCDUGALD e KJELLEBERG, 2006).

A densidade de *Vibrionaceae* e sua proporção nas contagens totais de placa variam amplamente de acordo com a metodologia de amostragem, áreas geográficas, e sazonalidade (AUSTIN *et al.*, 1979).

Tabela 2 – Dados de infecções por espécies de vibrios potencialmente patogênicas.

Espécie	Infecções em humanos				Infecções de animais aquáticos
	Gastroenterite/diarréia	Infecção de feridas	Infecção de ouvido/olho	Septicemias	
<i>V. cholerae</i> O1	++	+			
<i>V. cholerae</i> não O1	++	++	+	+	
<i>V. mimicus</i>	++	+	+	+	
<i>V. fluvialis</i>	++	+	+	+	
<i>V. parahaemolyticus</i>	++	+	+	+	
<i>V. alginolyticus</i>	+	++	++	+	+
<i>V. cincinnatiensis</i>	+			+	
<i>V. (Grimontia) hollisae</i>	++	+		+	
<i>V. vulnificus</i>	+	++		++	
<i>V. furnissii</i>	+				
<i>P. damsela</i>		++		+	++
<i>V. metschnikovii</i>	+	+		+	
<i>V. harveyi</i> (<i>V. carchariae</i>)		+			++

LEGENDA: ++ Infecção reportada e relativamente importante; + infecção reportada.

FONTE: ELLIOT *et al.*, 1995; NISHIBUCHI, 2006.

A composição da biota bacteriana no trato digestivo de animais marinhos claramente difere da água do mar circundante, pois a disponibilidade de matéria orgânica para os vibrios no intestino destes animais é maior do que na água circundante. Entretanto, este ambiente é representado por baixo pH, secreção de ácidos biliares, e condições microaeróbias ou

anaeróbias que são restritivas aos componentes da microbiota (URAKAWA e RIVERA, 2006).

Espécies de *Vibrio* mostram uma forte correlação com plâncton marinho, principalmente o zooplâncton. Em geral o zooplâncton abriga mais vibrios que o fitoplâncton. As espécies de *Vibrio* são as espécies bacterianas mais abundantes associadas com copépodes (SOCHARD *et al.*, 1979).

Recentemente, muitos estudos têm sugerido que os vibrios degradam alguns compostos ecologicamente perigosos como hidrocarbonos aromáticos policíclicos (RAMAIAH *et al.*, 2000) e são os maiores decompositores da quitina no oceano (NAGASAWA e TERAZAKI, 1987; HEDLUNG e STALEY, 2001). Vibrios também têm sido encontrados em rios (KENZAKA *et al.*, 1998), e já está bem estabelecido que o *V. cholerae* habita ambientes de água doce.

A quitina, composta por β 1,4-*N*-acetil-*D*-glucosamina, é o mais abundante polissacarídeo na natureza depois da celulose. Na biosfera aquática sozinha, mais de 10^{11} toneladas de quitina são produzidas anualmente. Esta vasta porção de material contendo carbono insolúvel é reciclada principalmente por bactérias quitinolíticas, incluindo membros da família *Vibrionaceae*. A quitina é encontrada em todos os reinos e é a principal componente das paredes celulares de fungos e dos exoesqueletos de crustáceos (MEIBOM *et al.*, 2004). Muitas das espécies de *Vibrio* que vivem em ambientes aquáticos são capazes de utilizar quitina como fonte única de carbono. Estudos do organismo marinho não-patogênico *Vibrio furnissii* têm mostrado que a utilização de quitina é um processo complexo que envolve pelo menos três passos principais: sensoriamento da quitina seja por colisão aleatória ou por quimiotaxia, fixação, captação e degradação (KEYHANI e ROSEMAN, 1999).

Interações mutualísticas com vibrios também têm sido amplamente estudadas. Um dos lugares mais comuns de se encontrar vibrios é o intestino de animais marinhos. Como muitas espécies de *Vibrionaceae* produzem quitinase (RAMAIAH *et al.*, 2000), a maioria destes animais precisam desta relação mutualística no seu processo de digestão (NISHIGUCHI e JONES, 2004).

Cepas de *Vibrio* caracterizadas por perfis idênticos ou similares de 16S rRNA (ribotipos) têm sido obtidos de ambientes geograficamente distantes, sugerindo uma flora costeira cosmopolita (THOMPSON e POLZ, 2006). A abundância costeira de vibrios tem sido relatada como 10^2 a 10^5 células/ml (EILERS *et al.*, 2000; HEIDELBERG *et al.*, 2002; THOMPSON *et al.*, 2005),

Quando *Vibrio* spp. são expostos a certos tipos de estresses, por exemplo, incubação de *V. vulnificus* no ambiente estuarino durante o inverno (OLIVER *et al.*, 1995), a contagem de células cultiváveis cai enquanto que a contagem de células totais permanece constante. Uma hipótese para esta discrepância é que estas células podem perder sua culturabilidade enquanto mantêm sua viabilidade e estão, portanto, num estado viável mas não cultivável (VBNC) (MCDUGALD e KJELLEBERG, 2006). Os primeiros relatos de células VBNC vieram de estudos realizados por Colwell e colegas (COLWELL *et al.*, 1985; XU *et al.*, 1982). A ressuscitação de células não cultiváveis *in vivo* tem grandes conseqüências para saúde humana e para a interpretação dos números de bactérias em água e alimentos (MCDUGALD e KJELLEBERG, 2006).

A importância epidemiológica das espécies patogênicas de *Vibrio* não foi reconhecida até a quinta pandemia de cólera, quando Robert Koch isolou uma bactéria móvel em forma de bacilo, *Vibrio cholerae* (então denominado como “comma bacilli”) das fezes de pacientes coléricos no Egito em 1883 e mais tarde na Índia em 1884 (FARUQUE e NAIR, 2006).

Está agora amplamente aceito que cepas patogênicas de espécies de *Vibrio* têm evoluído de cepas não patogênicas ambientais. Esta adaptação de espécies normalmente marinhas ou de águas estuarinas para o intestino humano possivelmente reflete uma necessidade de encontrar um nicho onde os organismos possam rapidamente amplificar. Recentemente, *V. parahaemolyticus* tem adquirido potencial pandêmico, como a segunda espécie de *Vibrio* depois do *V. cholerae* (FARUQUE e NAIR, 2006).

Embora a patogenicidade esteja sendo descrita para diversas espécies de *Vibrio* spp., os problemas sérios de saúde pública são devido geralmente a três espécies, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, principalmente no caso de doenças de veiculação alimentar por frutos do mar (FAO, 2005).

2.10 *Vibrio cholerae*

A cólera é uma doença antiga e devastadora que ainda ocorre em sua forma epidêmica em muitas partes do mundo, tirando centena de milhares de vidas cada ano. Historicamente, as epidemias e pandemias estão fortemente correlacionadas com condições sanitárias inadequadas, excesso populacional e fontes de água desprotegidas, condições que persistem até hoje em diversos locais (WHO, 2003).

Através da história, as populações ao redor do mundo têm sido esporadicamente afetadas por surtos devastadores de cólera. Registros de Hipócrates (460-377 a.C.) e Galeano

(129-216 d.C.) descreveram uma doença que poderia ter sido a cólera, e diversas sugestões indicam que uma enfermidade como a cólera também era conhecida nas planícies do rio Ganges desde a antiguidade (WHO, 2008). Primeiramente descrito por Pacini (1854), o vibrião colérico foi extensivamente estudado e a doença foi apropriadamente caracterizada como de veiculação hídrica por Robert Koch (1884) (COLWELL e HUQ, 2001). Em 1855 John Snow, observando a cólera, disse: “Viaja ao longo das grandes rotas do intercuro humano, nunca mais rápido que pessoas viajando, e geralmente muito mais vagarosamente. Na sua extensão para uma ilha nova ou continente, sempre aparece primeiro num porto marítimo” (SMITH, 2003).

Durante a epidemia em Londres, Snow mapeou os locais das casas cujas pessoas tinham morrido e notou que na área de Broad Street, os casos estavam agrupados em volta de uma bomba de água em particular. Existia um esgoto subterrâneo correndo perto da abertura, e as pessoas tinham relatado que a água da bomba estava repugnantemente fétida dias antes do surto. Assim que Snow persuadiu as autoridades a removerem a bomba manual e o número de casos e mortes por cólera caiu rapidamente.

Enquanto o papel da remoção da bomba na diminuição da taxa de mortalidade estava sendo debatido, a demonstração de Snow que a cólera estava associada com a água era uma contradição poderosa às teorias dos “miasmas” de transmissão através de vapores venenosos. Seu trabalho eventualmente levou a implantação de medidas sanitárias no Reino Unido que reduziram a ameaça da cólera, embora não com a mesma extensão em outras doenças diarréicas de outras causas. Um novo sistema de esgoto foi construído em Londres em 1880 (WHO, 2007).

A maioria das grandes epidemias que ocorreram durante os últimos 50 anos se originaram em regiões costeiras, incluindo o surto de cólera de 1991 que devastou a América Latina, surgindo na área costeira ao redor de Lima, Peru (COLWELL e HUQ, 2001). Suspeita-se que o lar ancestral da cólera seja o delta do Ganges no subcontinente indiano, onde epidemias de doenças semelhantes à cólera foram descritas antes mesmo do século 16. Deste lar ancestral, a cólera periodicamente varria o mundo em ciclos que se iniciavam abruptamente e então diminuía de repente. Em 1817, um grande festival religioso (Great Kumbh) no Ganges superior, que arrastou uma multidão de peregrinos de toda parte da Índia para se banharem nas águas sagradas, iniciou a primeira pandemia de cólera se espalhando da Índia até a península Árabe e então seguindo rotas de comércio para os litorais da África e Mediterrâneo (WHO, 2003).

Durante a segunda pandemia, que começou em 1826, a cólera viajou ao longo de rotas de comércio até chegar ao Afeganistão e Rússia em 1827. A doença chegou a Moscou em 1830 durante o meio da grande entrada dos mercadores, que “carregavam” a cólera com eles aos portos de chegada através da Europa. Em 1831, todas as grandes cidades na Rússia foram atingidas provocando quarentenas. Além disso, Londres, Paris e Estocolmo foram fortemente atingidas, e milhares morreram, sempre dentro de horas após os primeiros sintomas da doença (WHO, 2003).

Barcos a vapor tornaram possível a sobrevivência da cólera no cruzamento do Atlântico, e a doença chegou na América do Norte em 1832, primeiro em Montreal, Quebec, Nova York e Pensilvânia. A doença se espalhou rapidamente ao longo do litoral de lagos e nos delta de rios e no Canal Erie, e em torno de toda costa de Nova Orleans, onde os barcos a vapor levaram a doença até o rio Mississipi. A chegada da cólera coincidiu com a disponibilidade de revistas e jornais baratos, cujas matérias rapidamente incitaram a histeria pública (WHO, 2003).

Quatro pandemias se seguiram com enorme perda de vidas e grande prejuízo ao comércio. Entre 1817 e 1860, as mortes somente na Índia estavam estimadas em cerca de 15 milhões. Um pouco mais de 23 milhões de pessoas morreram na Índia entre 1865 e 1917. As mortes na Rússia neste período excederam 2 milhões de pessoas (WHO, 2003).

A atual pandemia, causada pelo biótipo El Tor do *V. cholerae* O1, começou em 1961 na Indonésia e rapidamente se espalhou para Ásia e Europa. Em 1970, a cólera entrou no continente africano – uma área que esteve livre da doença por mais de um século – em diversos lugares e rapidamente se estabeleceu. A cólera é agora endêmica através do continente africano, onde prospera sob a falta de condições sanitárias e despejo de dejetos. Em 2001, a África colaborou com 94% dos casos globais totais de cólera relatados à OMS. Na primeira metade de 2002, surtos envolvendo milhares de casos ocorreram na República democrática do Congo, Malawi e Moçambique (WHO, 2003).

Durante os anos 90, mais casos de cólera foram relatados à OMS do que em qualquer outra década desde que os relatos oficiais começaram. O biótipo El Tor que foi identificado primeiramente em 1960 entre os religiosos peregrinos, substituiu o biótipo clássico – responsável pela alta letalidade nas pandemias do século 19 – através do mundo nos anos 60. Ainda que o El Tor seja relativamente moderado e produza mais portadores assintomáticos, tem grande tempo de excreção de pessoas infectadas e grande habilidade de sobreviver em superfícies e em solo noturno. Estas características ajudam a definir condições favoráveis para

endemicidade e, portanto, tem implicações importantes no monitoramento e controle da cólera (WHO, 2003).

A sétima pandemia alcançou a América Latina em 1991, quando a primeira epidemia de cólera naquela região tinha ocorrido há um século no Peru. Em um ano, 400.000 casos e 4.000 mortes foram relatados de 11 cidades das Américas. Somente no Peru, a grande publicidade que foi gerada em torno da cólera custou à economia da cidade mais de US\$ 770 milhões em prejuízos para o comércio e turismo (WHO, 2003).

Como a sétima pandemia continua inabalada, a cólera permanece uma ameaça global necessitando de monitoramento constante e melhor preparação para lidar com as epidemias. A ameaça parece crescente. Em 1992, um novo sorogrupo – um derivado genético do biótipo El Tor – surgiu em Bangladesh e causou uma grande epidemia. Denominado *V. cholerae* O 139 Bengal, o novo sorogrupo tem sido detectado agora em 11 cidades e igualmente necessita de monitoramento constante. Enquanto nenhuma evidência está disponível para estabelecer a significância deste desenvolvimento, a possibilidade de uma nova pandemia não pode ser excluída. O El Tor, por exemplo, foi originalmente isolado como uma cepa não-virulenta em 1905 e subseqüentemente adquiriu virulência suficiente através da transferência de material genético, para causar a atual pandemia (WHO, 2003).

No Brasil (figura 7), a sétima pandemia chegou em 1991 e até 2001 atingiu todas as regiões do País, produzindo um total de 168.598 casos e 2.035 óbitos, com registro de grandes epidemias na região Nordeste. O coeficiente de incidência em 1993, ano em que ocorreu o maior número de casos, foi de 39,81/100.000 habitantes, com 670 óbitos e letalidade de 1,11%. Entre 1992 a 1994, ocorreu uma importante redução no número de casos, sendo esta queda acentuada a partir de 1995. Em 2001, foram registrados sete casos confirmados (quatro no Ceará, um em Pernambuco, um em Alagoas e um em Sergipe). Em 2002 e 2003 não foram detectados casos no Brasil. No primeiro semestre de 2004, foram registrados 21 casos no município de São Bento do Una, situado no agreste de Pernambuco. No primeiro trimestre de 2005, novos casos foram diagnosticados, no mesmo estado, sendo quatro em São Bento do Una e um no Recife (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Figura 7 – Casos de cólera registrados no Brasil de 1991 a 2006.

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008.

A cólera continua a ser um dos maiores riscos à saúde ao redor do mundo e é um dos indicadores sociais de desenvolvimento. A ocorrência, disseminação e extensão de um surto de cólera são extremamente difíceis de prever. Eles dependem de fatores múltiplos bem conhecidos, incluindo fator endêmico local, condições de habitação, movimentos populares forçados ou voluntários, fatores ambientais e culturais e a efetividade de qualquer medida de controle local. Mesmo onde existe conhecimento detalhado que é essencial para a avaliação do risco da cólera numa situação específica, cenários não esperados comumente dificultam a quantificação deste risco. Em algumas situações endêmicas, onde os surtos tendem a ocorrer em intervalos regulares, padrões sazonais podem ser antecipados, ainda assim a ocorrência e disseminação da cólera permanecem limitadas e sua predição necessita da análise de cada situação (WHO, 2006).

Desde 2005, a reemergência da cólera tem sido notada em paralelo com o crescente número de populações vulneráveis vivendo em condições sanitárias inadequadas. Enquanto a doença não passa de uma notificação em cidades onde os padrões mínimos de higiene são conhecidos, ela permanece uma ameaça em quase todos os países em desenvolvimento. O número de casos de cólera relatados à OMS durante 2006 cresceu dramaticamente,

alcançando os níveis dos anos 90. Um total de 236. 896 casos foram notificados em 52 cidades, incluindo 6.311 mortes, um aumento de cerca de 79% comparado com o número de casos relatados em 2005. Este aumento é resultado de diversos surtos que ocorreram em cidades onde os casos não costumavam ser notificados por diversos anos. Foi estimado que somente uma pequena proporção de casos, menos de 10%, é relatada à OMS (WHO, 2007c).

A cólera foi a primeira doença na qual o monitoramento e relatos foram iniciados em larga escala (WHO, 2000) e é uma das três doenças que precisam de notificação imediata à OMS, segundo normas da “International Health Regulations”, onde assinala que os primeiros casos de cólera (autóctones ou importados) devem ser relatados em até 24 horas (WHO, 2004).

É impossível evitar que a cólera seja introduzida numa zona, mas a propagação da doença dentro desta pode ser evitada com detecção e confirmação de casos imediatos, seguido de resposta adequada. Como a cólera pode ser um problema de saúde pública grave, podendo causar muitas mortes, propagar-se de maneira rápida e eventualmente internacionalmente, e afetar gravemente as viagens e o comércio, uma resposta bem coordenada e eficaz é de importância primordial (WHO, 2006).

A resposta a um surto de cólera focaliza geralmente os aspectos médicos que são importantes para reduzir a mortalidade. Contudo, há necessidade de uma resposta mais abrangente para limitar a propagação da doença. Como a resposta a surtos é geralmente dirigida por profissionais médicos, pode haver tendência para negligenciar outros aspectos, tais como problemas ambientais ou de comunicação (WHO, 2006).

A notificação da cólera é compulsória, porém ainda é comum casos não serem relatados. Predizer surtos potenciais ainda permanece difícil e é sempre complicado pela falta de dados em tendências e padrões (WHO, 2006).

No caso do Brasil, de acordo com a Portaria da Secretária de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde Nº 5 de 21 de fevereiro de 2006, Anexo I, todo caso de cólera é de notificação obrigatória às autoridades locais de saúde. Deve-se realizar a investigação epidemiológica em até 48 horas após a notificação avaliando a necessidade de adoção de medidas de controle pertinentes. A investigação deverá ser encerrada até 60 dias após a notificação. A unidade de saúde notificadora deve utilizar a ficha de notificação/investigação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan encaminhando-a para ser processada, conforme o fluxo estabelecido pela Secretaria Municipal de Saúde. De acordo com esta Portaria, Anexo II, um caso de cólera deve ser notificado em até 24 horas à Secretaria Municipal de Saúde - SMS, por serviço telefônico. Caso a SMS e/ou SES não

disponham de infra-estrutura, principalmente nos fins de semana, feriados e período noturno, a notificação deverá ser feita à Secretaria de Vigilância em Saúde, por meio telefônico ou eletrônico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

É importante o monitoramento da presença de *V. cholerae*, independentemente do sorotipo ou sorogrupo, patogenicidade, ou virulência devido à descoberta da transferência lateral de genes que pode realmente ocorrer no ambiente aquático (CHAKRABORTY *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado que células de *V. cholerae* não-O1 podem se converter à cólera epidêmica sorotipo O1 e vice-versa (COLWELL *et al.*, 1995). Existem inúmeras evidências que a conversão do sorogrupo O1-O139 confere uma vantagem seletiva nos reservatórios ambientais e no trato gastrointestinal humano. Foi demonstrado que este é resistente à atividade lítica do fago O1, um achado que sugere que este mecanismo serve para evitar a predação por fagos nos ambientes aquáticos (WALDOR e MEKALANOS, 1994; BLOKESCH e SCHOLLIK, 2007).

O *V. cholerae* é classificado com base nos antígenos somáticos (antígenos O) dentro de sorogrupos (BAUMMAN *et al.*, 1984). Esta espécie é atualmente constituída de 206 sorogrupos (RIVERA *et al.*, 2001), sendo que destes, somente dois sorogrupos, O1 e O139, são os causadores da cólera epidêmica. Os vibrios não O1/não O139 estão amplamente distribuídos no ambiente aquático e podem causar pequenos surtos de diarreia, além de outras enfermidades extraintestinais como septicemia, cistite, celulite (VARNAM e EVANS, 1991). O sorogrupo O1 pode ser subdividido em três serovars; o Ogawa e Inaba, que se aglutinam somente com seu anti-soro específico, e o Hikojima, que se aglutina com os anti-soros tanto do Inaba quanto do Ogawa. Estes sorotipos podem pertencer a dois biótipos, o clássico e o El Tor, cuja distinção baseia-se em características bioquímicas e susceptibilidade a bacteriófagos (BAUMMAN *et al.*, 1984).

Cepas do biótipo El Tor estão agrupadas em quatro clones: (I) da sétima pandemia; (II) da costa do golfo dos Estados Unidos; (III) da Austrália; (IV) da América Latina (de difícil distinção de cepas da sétima pandemia por produzirem padrão similar na técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis) (WACHSMUTH *et al.*, 1993).

V. cholerae é uma bactéria autóctone do ambiente marinho. Têm sido demonstrado que esta bactéria têm predileção para associar-se a superfícies quitinosas, e/ou bainhas mucilaginosas de copépodes e algas. Em áreas endêmicas e epidêmicas o *V. cholerae* O1 patogênico pode penetrar nos sistemas aquáticos superficiais, incluindo aqueles utilizados como fonte de água potável (VARNAM e EVANS, 1991) e por isso os alimentos marinhos são uma via importante de transmissão da cólera, sendo as ostras os principais vetores.

Os sintomas da infecção por *V. cholerae* variam de uma diarreia branda até uma doença severa fatal. A forma mais severa (cholera gravis) é causada somente por cepas do sorogrupo O1 e O139. Conseqüentemente, os agentes envolvidos na cólera precisam ser claramente identificados como *V. cholerae* toxigênicos. Sorotipos não-O1/não-O139 estão raramente associados com casos esporádicos de gastroenterite (FAO, 2005). A diarreia resulta numa enorme perda de fluído, que pode exceder a um litro por hora e que pode resultar em desidratação e colapso circulatório (VARNAM e EVANS, 1991). Se não tratada, esta desidratação pode levar a um choque hipovolêmico e à morte do paciente dentro de 18 horas até poucos dias, ou em casos extremos pouco depois do início dos sintomas. A taxa de casos fatais quando não tratados pode chegar a 30-50%. Entretanto se o tratamento é imediato e aplicado apropriadamente essa taxa cai para menos de 1% (WHO, 2004).

Os fatores associados à virulência que podem ser considerados fundamentais ao *V. cholerae* são a presença da toxina colérica (CT), que é responsável pela diarreia severa e o fator de colonização conhecido como toxina co-regulatória do pilus (TCP), que é responsável pela adesão e têm papel importante na colonização da mucosa do intestino em humanos (HERRINGTON *et al.*, 1988; FARUQUE *et al.*, 1998). Está amplamente aceito que o *V. cholerae* toxigênico produz a toxina colérica (CT) e esta é codificada pelo gene *ctx*. Os genes que codificam para CT formam parte do genoma de um bacteriófago lisogênico filamentosos conhecido como CTXφ (WALDOR e MEKALANOS, 1996). O fator pilus de colonização TCP é também conhecido por agir como um receptor para o CTXφ, que pode infectar *V. cholerae* não toxigênicos, levando ao surgimento de novas cepas toxigênicas. Os genes que codificam os principais fatores de virulência são encontrados em agrupamentos, aparentemente podem se propagar lateralmente e se dispersar entre diferentes cepas (HACKER *et al.*, 1997; SACK *et al.*, 2004). O gene *tcpA* é parte de uma ilha de patogenicidade de cerca de 39.5 kb, conhecida como ilha de patogenicidade de *V. cholerae* (VPI) (KARAOLIS *et al.*, 1998). Cepas ambientais não possuem ou possuem com menor frequência o cassete de gene de virulência que contém os genes que codificam a toxina colérica (*ctx*), a toxina zonula occludens (*zot*), e a toxina acessória da cólera (*ace*) (RIVERA *et al.*, 2001).

A cólera é uma doença exclusivamente humana e nenhuma espécie animal têm sido encontrada consistentemente infectada. A presença do microrganismo no ambiente aquático não está correlacionada diretamente com a presença de coliformes termotolerantes, mas nutrientes despejados com o esgoto humano podem aumentar a sua sobrevivência. *V. cholerae* pode sobreviver por longos períodos na água morna sem nutrientes, mas com salinidade de

0.25-3.0‰ e pH de aproximadamente 8 (MILLER *et al.*, 1984). O trabalho de Colwell e Spira (1992) demonstrou que o *V. cholerae* O1 pode sobreviver na água por tempo indefinido, sendo, portanto, um organismo autóctone aquático. *V. cholerae* O1 do mesmo biótipo, sorotipo, tipo de fago e perfil de toxinas foi isolado por mais de 30 anos em locais como o Golfo do México (BLAKE *et al.*, 1983; SHANDERA *et al.*, 1983).

Nos ambientes aquáticos tem sido observada uma forte associação entre os níveis de zooplâncton e a incidência de *V. cholerae* (HUQ *et al.*, 1983) devido sua capacidade de digerir a quitina favorecendo sua persistência no ambiente (COLWELL e SPIRA, 1992). Utilizando dados de temperatura de sensoriamento remoto para auxiliar a estimar “blooms” de fitoplâncton e zooplâncton na Baía de Bengal, Bangladesh, foi construído um sistema global de alerta para a cólera (LOBITZ *et al.*, 2000).

Segundo o International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1996), a temperatura ótima para o crescimento do *V. cholerae* O1 é 37°C, com uma faixa de 10 a 43°C. O pH ótimo é 7.6, mas pode crescer numa faixa de 5.0 a 9.6. Para atividade da água o ótimo para crescimento é 0.984, variando de 0.970 até 0.998. O crescimento também pode ocorrer numa variação de sal de 0.1 a 4.0% de cloreto de sódio (NaCl), com crescimento ótimo em 0.5% de NaCl.

A dose infecciosa da bactéria necessária para causar as manifestações clínicas varia de acordo com a via de administração. Se ingeridas com água, a dose infecciosa é de 10^3 a 10^6 organismos. Quando ingeridas com alimentos menos organismos são necessários para causar a doença (10^2 a 10^6) (HANDA, 2007).

2.11 *Vibrio parahaemolyticus*

A história do *V. parahaemolyticus* começou em 20 e 21 de Outubro de 1950, quando um surto de intoxicação alimentar ocorreu no subúrbio sudeste de Osaka, Japão. Dos 272 pacientes que sofreram gastroenterite aguda, 20 morreram. Os sintomas incluíram dor abdominal aguda, vômito, e diarreia aquosa e em alguns casos, fezes sanguinolentas. O alimento suspeito de causar a intoxicação foi uma sardinha pequena semi-dessecada, *Engradis japonica* Houttuyn, chamada “shirasu” em japonês. A sardinha é cozida em água salgada e ingerida quando está parcialmente seca (JOSEPH *et al.*, 1982).

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria halófila Gram-negativa, componente da biota normal dos estuários, da água do mar e de alguns organismos que nela vivem. O número de *Vibrio parahaemolyticus* na água do mar estaria associado à concentração de zooplâncton,

especialmente a copépodes e à temperatura. Isto indicaria que as concentrações na água do mar podem variar com fatores que produzam variações do zooplâncton, incluindo temperatura, luminosidade, correntes marinhas, concentração de nutrientes, concentração do fitoplâncton, entre outros (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

V. parahaemolyticus produz uma quitinase e pode ter a maior importância na ciclagem de materiais quitinosos no ambiente estuarino. A bactéria desaparece da coluna d'água durante os meses frios e aumenta durante os meses quentes com o aumento do zooplâncton, esta interação provavelmente beneficia a bactéria e auxilia na sobrevivência deste organismo mesófilo sob temperaturas reduzidas (CHAI e PACE, 1994). A temperatura máxima de crescimento é de 42°C-44°C, a concentração ótima de NaCl para o organismo varia de 2%-4%, acima de 10% o crescimento é inibido. A faixa de pH ótima é de 7.5 a 8.6, mas o organismo pode sobreviver a um pH de 4.8 a 11.0, sendo que a aderência a superfícies quitinosas e a produção do flagelo lateral são afetados pelo pH (CHAI e PACE, 1994).

V. parahaemolyticus causa principalmente uma forma branda de diarreia, cólica abdominal e náuseas adquiridas principalmente pelo consumo de frutos do mar contaminados, em particular crustáceos e moluscos, secundariamente produz infecções em feridas. O aparecimento dos sintomas após o consumo de alimentos contaminados varia de 4 a 96 horas, a doença é normalmente autolimitada e persiste por 3-4 dias (CHAI e PACE, 1994). Em raras ocasiões, a infecção pode resultar em septicemia que pode ser tornar fatal, porém isto ocorre sempre em pacientes que possuem uma doença pré-existente (FDA, 2001).

O primeiro caso de doença causado pelo consumo de alimento contaminado associado com infecção por *V. parahaemolyticus* nos Estados Unidos ocorreu em Maryland em 1971 com um surto causado por caranguejos contaminados cozidos a vapor (DADISMAN *et al.*, 1972). Já no Brasil o primeiro relato ocorreu em 1983, onde foi isolada de fezes diarreicas de uma criança de Cascavel, Ceará, uma cepa Kanagawa positiva de *V. parahaemolyticus* sorotipo O5:K17 (HOFER, 1983).

V. parahaemolyticus têm sido separado em 13 sorotipos O termoestáveis e 71 sorotipos K termo-lábeis. Seu flagelo lateral tem dois determinantes antigênicos que são diferentes daqueles do flagelo polar, sendo que a aglutinação com o antissoro do flagelo lateral tem sido utilizada para a identificação (CHAI e PACE, 1994; YEUNG e BOOR, 2004).

Cepas patogênicas geralmente produzem uma hemolisina termoestável direta (TDH) que está associada com o fenômeno Kanagawa (K+) ou hemólise no ágar Wagatsuma e/ou uma hemolisina relacionada ao TDH (TRH). Os genes *tdh* e *trh* codificam respectivamente para TDH e TRH; o gene *tdh* têm sido usado como marcador para provas de DNA, sendo que

um ou ambos os genes são detectados na maioria das cepas clínicas, mas são incomuns em isolados ambientais. O fenômeno Kanagawa é produzido por 95% dos isolados clínicos, enquanto que 2% ou menos dos isolados ambientais os produzem. Entretanto, têm sido encontradas recentemente cepas Kanagawa negativas capazes de causar a doença (HONDA *et al.*, 1987).

Desde 1996, a gastroenterite causada por um sorotipo específico de *V. parahaemolyticus*, o O3:K6, têm sido amplamente disseminado no Sudoeste da Ásia, Leste da Ásia incluindo Japão, e na América do Norte. A cepa O3:K6 isolada desde de 1996 produz TDH mas não produz TRH, enquanto que cepas O3:K6 isoladas antes de 1996 produziam somente TRH (OKUDA *et al.*, 1997).

Condições extremas como temperatura e estados nutricionais alterados podem levar o *V. parahaemolyticus* a entrar no estágio viável não cultivável (VBNC) (JIANG e CHAI, 1996; MIZUNOE *et al.*, 2000; JOHNSTON e BROWN, 2002). As células permanecem viáveis com alterações na forma usual, entretanto suas funções metabólicas e sua membrana permanecem inalteradas (COUTARD *et al.*, 2007).

Diversos estudos demonstraram a transferência horizontal genética entre cepas de *V. parahaemolyticus*. Por exemplo, têm sido demonstrada a presença de variantes do *tdh* no DNA plasmidial, DNA cromossomal (NISHIBUCHI e KAPER, 1990) e em outras espécies de *Vibrio* spp., dando suporte à hipótese de que este gene é móvel entre as populações bacterianas. A presença de fagos no *V. parahaemolyticus* é comum (CHANG *et al.*, 1998)

Algumas cepas de *V. parahaemolyticus* que possuíam o *tdh* foram KP-negativas, sugerindo que a mera presença deste gene pode não refletir na capacidade da cepa em causar doença, uma vez que a expressão da TDH pode variar (HOASHI *et al.*, 1990). Estas cepas podem produzir outros tipos de hemolisinas relacionadas (YEUNG e BOOR, 2004). A hidrólise da uréia tem sido proposta como um marcador de virulência adicional para algumas cepas patogênicas tendo sido demonstrado uma forte associação entre a presença do gene *trh* e a produção de urease (SUTHIENKUL *et al.*, 1995; OSAWA *et al.*, 1996; OKUDA *et al.*, 1997), principalmente para cepas de *V. parahaemolyticus* O4 associados a surtos esporádicos no Pacífico (KAYSNER *et al.*, 1994).

Dados obtidos de sequenciamento genômico identificaram a presença de uma ilha de patogenicidade na cepa clínica de *V. parahaemolyticus* O3:K6 KP+ (MAKINO *et al.*, 2003), confirmando também a existência de dois cromossomos circulares (3,3 e 1,9 Mbp) nesta espécie (TAGOMORI *et al.*, 2002). Ambos contêm os genes essenciais para o crescimento e viabilidade, entretanto a maioria destes estão localizados no cromossomo maior. A ilha de

patogenicidade, que está localizada no cromossomo menor, têm conteúdo GC de 39,8%, em contraste com a média de conteúdo de 45,4% do restante do genoma, sugerindo que esta foi adquirida por transferência horizontal. Esta ilha abriga dois genes *tdh* assim como outros genes que tem sido associados com a virulência em outros organismos, incluindo aqueles que codificam homólogos ao fator citotóxico necrosante de *E. coli* e à exoenzima T de *Pseudomonas* (YEUNG e BOOR, 2004).

Entre os genes identificados nesta ilha de patogenicidade estão aqueles que codificam um sistema de secreção do tipo III (TTSS), que é um fator de virulência central em bactérias como *Shigella* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* enteropatogênica, causando gastroenterite pela invasão ou interação íntima com as células epiteliais intestinais (YEUNG e BOOR, 2004; FDA, 2005).

Segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE-SP), faz parte como medidas de controle para a ocorrência *Vibrio parahaemolyticus*, a notificação imediata da ocorrência de surtos (2 ou mais casos), além da notificação às autoridades de vigilância epidemiológica municipal, regional ou central, para que se desencadeie a investigação das fontes comuns e o controle da transmissão através de medidas preventivas e educativas. As medidas preventivas implicam no consumo de produtos adequadamente cozidos ou refrigerados e na educação dos manipuladores de alimentos sobre os fatores de risco/proliferação e contaminações cruzadas. As medidas em epidemias implicam em investigação dos surtos e identificação de fontes de transmissão e na conscientização da população sobre os riscos de ingestão de produtos do mar crus e outras medidas sobre o preparo de alimentos (CVE, 2003a).

No Japão cerca de 20-30% das intoxicações alimentares são pelo consumo de frutos do mar crus ou parcialmente cozidos contaminados com *V. parahaemolyticus* (ALAM *et al.*, 2002). E nos Estados Unidos é uma das principais causas de infecções por consumo de frutos do mar crus (FDA, 2005). Na Europa foram reportados casos na Espanha (MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2007), Itália (OTTAVIANI *et al.*, 2008), França (QUILICI *et al.*, 2005) e Rússia (NAIR *et al.*, 2007). Também foram relatados surtos no Peru (GIL *et al.*, 2007) e Chile (CORDOVA *et al.*, 2002; GONZÁLEZ - ESCALONA, 2005; FUENZALIDA *et al.*, 2006).

No Brasil existem estudos sobre a presença de *V. parahaemolyticus* em água, ostras, mariscos, lagostas e peixes (GELLI *et al.*, 1979; FRANCA *et al.*, 1980; HOFER e SILVA, 1986; MAGALHÃES *et al.*, 1991; MATTÉ *et al.*, 1994; BARBONI, 2003; SOUSA *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005), porém dados sobre infecção em humanos são escassos.

2.12 Vibrio vulnificus

V. vulnificus foi primeiramente isolado pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) em 1964 e foi erroneamente identificado como *Vibrio parahaemolyticus*. Foi reconhecido como uma espécie distinta em meados de 1970, quando se observou que muitos casos clínicos de septicemias de veiculação alimentar e infecções em feridas eram causados por um patógeno com características distintas de outras espécies de *Vibrio* (PETERKIN, 1994; STROM e PARANJPYE, 2000). A bactéria foi designada como *V. vulnificus* em 1980 (FARMER, 1980).

V. vulnificus pode infectar humanos através da exposição de feridas em água ou consumo de frutos do mar. Sob certas condições, como uma variedade de atributos de virulência e fatores de suscetibilidade do hospedeiro (FAO/WHO, 2005), esta bactéria tem a habilidade de causar infecções sérias e sempre fatais. Isto inclui uma septicemia invasiva geralmente contraída através do consumo de mariscos crus ou mal cozidos, assim como infecções em feridas adquiridas através do contato com mariscos ou águas marinhas onde o organismo está presente (PETERKIN, 1994; STROM e PARANJPYE, 2000; HARWOOD *et al.*, 2004). Também tem sido relatado em casos de gastroenterite (GULIG, 2005).

V. vulnificus causa uma infecção severa sistêmica com alta taxa de mortalidade especialmente entre os indivíduos imunocomprometidos (BLAKE *et al.*, 1980). Mesmo com tratamento, as taxas de mortalidade para septicemia podem ser maiores que 75% e para infecção em feridas maiores que 50% (HLADY e KLONTZ, 1996; GULIG *et al.*, 2005). A incidência da septicemia por *V. vulnificus* é baixa na população geral e está estimada em 0,6 por milhão. Entretanto, é responsável por 95% de todas as mortes associadas ao consumo de frutos do mar nos Estados Unidos (OLIVER 1989; HAQ *et al.*, 2005).

Tanto na septicemia quanto na infecção de feridas nota-se uma replicação extremamente rápida da bactéria nos tecidos do hospedeiro com danos extensivos do tecido da pele. De fato, a morte pode ocorrer em 24 horas após o contato com a bactéria (HLADY e KLONTZ, 1996; VOLLBERG e HERRERA, 1997; STROM e PARANJPYE, 2000). Tipicamente, os indivíduos afetados apresentam febre, hipotensão e lesões secundárias bulbosas características da pele (HALOW *et al.*, 1996; VOLLBERG e HERRERA, 1997). Estas grandes lesões bulbosas são cheias de fluido hemorrágico, mas podem formar úlceras necróticas ou sempre se tornam gangrenosas. As lesões na pele são rapidamente progressivas e tipicamente confinadas a regiões subcutâneas (HALOW *et al.*, 1996). As extremidades que exibem estas lesões são geralmente inflamadas e doloridas devido à abertura vascular. A

destruição severa do tecido que ocorrem sempre acarretam em amputação ou destruição do tecido dos membros afetados (BLAKE *et al.*, 1980; LINKOUS e OLIVER, 1999; STROM e PARANJPYE, 2000).

A septicemia está associada a vários fatores de predisposição como hemocromatose, cirrose, diabetes, baixa imunidade e falência renal (BULLEN *et al.*, 1991; HLADY e KLONTZ, 1996).

Os sintomas e a severidade da doença dependem do tipo de infecção. Pacientes com septicemia primária geralmente mostram sintomas de febre e calafrios, sempre com vômito, diarreia e dor abdominal, assim como dor nas extremidades. Dentro das 24 horas de infecção aparecem nas extremidades de muitos pacientes, lesões secundárias cutâneas, incluindo celulite e equimoses. Mais de 60% dos pacientes sofrem choque séptico com pressão sanguínea sistólica abaixo de 90 mmHg. A gastroenterite é caracterizada por vômito, diarreia ou dor abdominal, cultura de fezes positiva e cultura de sangue negativa para *V. vulnificus*, e não evidência de feridas, sendo que não foram relatados casos de morte nesta forma de infecção (PETERKIN, 1994).

V. vulnificus está mundialmente distribuído e ocorre naturalmente em ambientes estuarinos e marinhos. Prefere locais de climas tropicais e subtropicais, prolifera em áreas onde a temperatura da água varia de 9 a 31°C e salinidades maiores que 25 ppt têm um efeito adverso na sobrevivência do organismo (O'NEIL *et al.*, 1992; ARIAS *et al.*, 1998; STROM e PARANJPYE, 2000). Têm sido isolado de uma ampla variedade de organismos marinhos, como ostras, caranguejos, peixes, mariscos e plânctons, e também da água e do sedimento (CERDÁ-CUÉLLAR *et al.*, 2000). É um vibrio marinho lactose-positivo, porém foi relatado que tipos selvagens de cepas desta espécie eram incapazes de utilizar a lactose, demonstrando a habilidade de muitas adquirirem propriedades de mutação (PETERKIN, 1994). O sequenciamento do DNA da cepa de *V. vulnificus* YJ 106 biótipo 1 revelou que esta bactéria possui dois cromossomos e um plasmídeo de 48,5 kb (CHEN *et al.*, 2003).

Depois da infecção através da ingestão de frutos do mar, as células bacterianas se fixam nas células epiteliais intestinais através do pili, e então produzem uma hemolisina que pode acelerar a invasão do patógeno para a corrente sanguínea. Na corrente sanguínea, a bactéria sobrevive e cresce causando subsequente a septicemia. A presença da cápsula é mais importante neste estágio da infecção, pois esta é crucial para a resistência aos sistemas de defesa do hospedeiro incluindo ação bactericida da cascata do complemento e a fagocitose pelos neutrófilos e macrófagos, sendo, portanto, um dos fatores de virulência mais importantes. A maioria das cepas ambientais encapsuladas de *V. vulnificus* tem potencial para

causar doença (SIMPSON *et al.*, 1987; PETERKIN, 1994; GULIG *et al.*, 2005). A presença de cápsula é relacionada à morfologia da colônia, com cepas encapsuladas sendo opacas e cepas sem cápsulas sendo translúcidas (YOSHIDA *et al.*, 1985). Mutantes sem cápsulas, que ocorrem naturalmente por variação de fase ou como resultado de mutações induzidas, são atenuados em ratos modelos de infecções e são suscetíveis à atividade bactericida no soro humano (PETERKIN, 1994).

Outros possíveis fatores associados à virulência relatados são: capacidade de aderir à superfície de células e a subsequente colonização do intestino na etapa primária da infecção e habilidade de obter ferro da transferrina (PETERKIN, 1994; CHOI *et al.*, 2002; OLIVER, 2006). Já está bem estabelecido na patogênese do *V. vulnificus* que o ferro sérico elevado no hospedeiro resulta em grande aumento da suscetibilidade à infecção. Foram identificados na bactéria sideróforos captadores de ferro e proteínas que se ligam a proteínas que contêm ferro do hospedeiro, assim como em outros patógenos bacterianos invasivos (GULIG, 2005).

A produção de hemolisina pode possivelmente induzir a citólise e/ou apoptose de várias células eucarióticas, podendo providenciar alguns efeitos sinérgicos neste estágio. O ferro é um fator essencial para o crescimento de praticamente todas as bactérias. Finalmente, o patógeno invade o tecido cutâneo, onde produz uma metaloprotease tóxica causando danos hemorrágicos e edematosos na pele (MIYOSHI, 2006; GULIG, 2005; STROM e PARANJPYE, 2000).

V. vulnificus têm sido classificado baseado em biótipos, antígenos lipopolissacarídeos (LPS), cápsula e mais recentemente em seqüências genéticas (GULIG, 2005). Existem três biótipos que têm sido estabelecidos baseados em características, como produção de indol, especificidade do hospedeiro, sorotipo e subtipagem genética (HARWOOD *et al.*, 2004), o biótipo 1 que é predominantemente patógeno humano, o biótipo 2, que está primariamente associado com enguias e o biótipo 3 que foi identificado em humanos carregadores de peixes em Israel (BISHARAT *et al.*, 1999). As cepas do biótipo 2 possuem um único tipo de LPS, que resultou na sua denominação como sorogrupo E (BIOSCA *et al.*, 1996). Em contraste, um número limitado de cepas do biótipo 1 foi inicialmente dividido em cinco grupos de LPS baseados na reação com anticorpos monoclonais (MARTIN & SIEBELING, 1991). Quando este grupo de anticorpos monoclonais foi utilizado para examinar uma grande parte de cepas de fontes ambientais, clínicas e de frutos do mar comercializados, um número significativo de cepas não foi tipável (39 a 49%), indicando que o LPS é mais complexo na sua heterogeneidade antigênica (GULIG, 2005).

Nos Estados Unidos, 60% de todos os casos de infecção por *V. vulnificus* são devido à infecção de feridas (MOUZIN *et al.*, 1997). Medidas preventivas para o controle deste patógeno são difíceis de implementar devido à sua presença normal em água costeiras mornas onde as pessoas usufruem de inúmeras atividades recreacionais.

A dose infecciosa mínima não está bem estabelecida, entretanto mariscos com níveis de 10^3 *V. vulnificus*/g têm sido implicados em doenças (CDC, 2005).

A maioria das publicações de infecções por *V. vulnificus* envolve casos esporádicos. Portanto, esta bactéria não está envolvida em surtos típicos de doenças de veiculação alimentar. A doença e as contagens de *V. vulnificus* variam de acordo com a flutuação da temperatura, sendo que a maioria dos casos ocorre durante os meses quentes. Assim como ocorre com outras espécies de *Vibrio*, a causa da perda de culturabilidade desta bactéria nos meses frios é creditada principalmente a sua entrada no estágio VBNC (OLIVER, 2006).

Segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE-SP), faz parte como medidas de controle para a ocorrência *Vibrio vulnificus*, a notificação de surtos (2 ou mais casos) com a notificação imediata às autoridades de vigilância epidemiológica municipal, regional ou central, para que se desencadeie a investigação das fontes comuns e o controle da transmissão através de medidas preventivas e educativas, medidas preventivas, que implica no consumo de produtos adequadamente cozidos e no alerta para as pessoas com doenças graves e imunodeprimidos sobre o risco do consumo de produtos do mar crus e, medidas em epidemias, que implica na investigação dos surtos e identificação de fontes de transmissão e conscientização da população sobre os riscos de ingestão de produtos do mar crus (CVE, 2003b).

Diversos estudos têm relatado a presença de *V. vulnificus* ao longo da costa do Golfo (DE PAOLA *et al.*, 1994; LEVINE *et al.*, 1993; TAMPLIN *et al.*, 1982), na costa Leste (OLIVER *et al.*, 1982, 1983) e Oeste (KAYSNER *et al.*, 1987) dos Estados Unidos, assim como em águas costeiras da Dinamarca (HOI *et al.*, 1998), Hong Kong (CHAN *et al.*, 1986), Alemanha, Holanda, Itália, Espanha (VEENSTRA *et al.*, 1994; MERTENS *et al.*, 1979; BAFFONE *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2002;), Japão (INOUE *et al.*, 2008) e cidades na África e America do Sul (MATTÉ *et al.*, 1994; OLIVER, 1989). Estudos de análise de risco têm sido feitos pela FAO/WHO (2005) focando o risco da presença de *V. vulnificus* em ostras cruas.

3 JUSTIFICATIVA

O ambiente marinho é uma grande fonte de microrganismos do gênero *Vibrio*, que eventualmente poderiam ser patogênicos, por isso é essencial que se caracterize os possíveis perigos e que se avalie o risco da sua presença no ambiente aquático, assim como suas relações ecológicas.

Trabalhos recentes descrevem o surgimento de novas cepas com potencial epidêmico, através da interação entre cepas por meio de transferência lateral, interação com fagos e outros mecanismos. Portanto, a disseminação de microrganismos alóctones por meio da água de lastro de navios de carga e sua possível relação com o surgimento de surtos esporádicos de doenças em determinados locais faz com que seja necessário se estabelecer programas de vigilância para o seu controle.

As espécies de vibrio que representam maior risco para a saúde publicam e estão diretamente implicadas em surtos de veiculação hídrica e alimentar são *V. cholerae* (Vc), *V. parahaemolyticus* (Vp) e *V. vulnificus* (Vv). Pouco se conhece no Brasil a respeito da distribuição destas populações nos ambientes costeiros, e também do perigo que estas podem representar. Por isso é necessário direcionar estudos apropriados a fim de caracterizar os perigos microbiológicos presentes nos ecossistemas marinhos para a prevenção de surtos pelo consumo de alimentos marinhos e uso recreacional destas águas.

Assim, através da análise da presença destas três espécies de bactérias na água do mar, bivalves e água de lastro, bem como o estudo da sua relação clonal molecular, será possível fornecer subsídios para o estabelecimento de programas de vigilância epidemiológica, de avaliação do risco e de monitoramento evitando-se assim uma possível disseminação e estabelecimento destes patógenos em condições favoráveis.

3.1 Objetivos Gerais

A proposta deste estudo foi avaliar a presença de microrganismos viáveis do gênero *Vibrio* e de Vc, Vp e Vv, que têm maior impacto para a saúde pública e sua relacioná-los de acordo aos indicadores microbiológicos e variáveis físico-químicas dos ecossistemas marinhos, incluindo amostras de água, plâncton e bivalves. Também avaliar e verificar a presença e variação destes vibrios na água de lastro de navios que atracaram nos principais portos brasileiros.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração de vibrios, pela contagem em placa, em amostras de água e plâncton coletados em tanques de lastro de navios e água e plâncton de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo.
- Determinar a concentração de vibrios, pela contagem em placa, em amostras de bivalves coletados em áreas portuárias brasileiras e região costeira do Estado de S. Paulo.
- Realizar a identificação e caracterização molecular, em nível de espécie, fatores associados à virulência e clonalidade; de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* isolados de amostras coletadas em tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo.
- Relacionar os resultados obtidos em amostras de água de lastro de navios que atracaram em portos brasileiros com os dados das amostras de água dos portos brasileiros selecionados.
- Comparar os resultados obtidos nas três áreas analisadas da região costeira do Estado de S. Paulo: Santos, S. Sebastiao e Ubatuba.
- Avaliar a presença de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* no ecossistema marinho.
- Obter dados científicos para subsidiar um possível estudo de avaliação de risco e implantação de programas de monitoramento para prevenção de possíveis surtos, tanto de veiculação hídrica quanto alimentar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização das áreas de estudo

4.1.1 Ambiente costeiro do Estado de São Paulo

Com cerca de 880 km de extensão de linha de costa, o litoral de São Paulo abrange 16 municípios, com área total de 7.759 km², incluindo Cubatão. Foram selecionadas as áreas de Santos, São Sebastião e Ubatuba (Figura 8) no ambiente costeiro do Estado de São Paulo para a realização da coleta de água do mar, plâncton e bivalves. Em cada área foram selecionados dois pontos de coleta de acordo com o impacto antrópico observado, exceto em Santos, onde foram selecionados três pontos de coleta.

Figura 8 – Áreas de amostragem no Estado de São Paulo, Brasil.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2008.

4.1.2 São Sebastião

A cidade de São Sebastião, litoral norte do Estado de S. Paulo, foi fundada no século XVI integrando as defesas da Capitania de São Vicente e está a 199 km da capital. Faz divisa com Caraguatatuba ao norte, Bertioga ao sul e Ilhabela através do Canal de São Sebastião. Possui uma área de 401 km² ocupada em grande parte pela Mata Atlântica. A planície costeira é estreita e o litoral bastante recortado, composto por 42 praias, sempre separadas por um

costão rochoso. A concentração urbana do município ocorre na face voltada para o canal de São Sebastião, onde se encontra a sede do município e o terminal Petrolífero da Petrobrás (CETESB, 2008). O terminal petrolífero “Almirante Barroso” é o principal gerador de renda para esse município [CETESB, 2008; SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO (SMA), 2006]. São Sebastião possui 5 estações de tratamento de esgoto e dois emissários submarinos em funcionamento, número significativo, se comparado aos outros municípios do Litoral Norte, contudo, ainda insuficiente, pois o percentual de cobertura domiciliar é de 36,5%.

A população fixa do município está em aproximadamente 57.300 habitantes, com densidade demográfica (incluindo a área do Parque Estadual da Serra do Mar) de 143 hab./km². Em períodos de temporada (verão e finais de semana prolongados), a população aumenta consideravelmente, podendo chegar a 44.041 pessoas a mais (FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS, 2004), alterando a rotina local e a demanda por água, coleta de esgoto e lixo (CETESB, 2008).

O Porto de São Sebastião iniciou suas atividades em 1963 e desde 1993 é operado pela Dersa que responde como autoridade portuária em São Sebastião. Localizado a 200 km do município de São Paulo, movimenta em torno de 400 mil toneladas/ano, e os principais produtos de importação são produtos químicos e siderúrgicos, malte e cevada; e de exportação são produtos siderúrgicos, máquinas e equipamentos, carga geral e veículos (CETESB, 2008).

Para o estudo foram selecionados 2 pontos de amostragem em São Sebastião. O ponto 1 tinha localização na praia do Cabelo gordo, com latitude 23°49'50''S e longitude 45°25'20''; e o ponto 2 na praia do Segredo, com latitude 23°49'56''S e longitude 45°25'51'' (figura 9). A coletas ocorreram mensalmente durante o período de Fevereiro de 2006 a Junho de 2006 e o total obtido foram 8 amostras de água (ponto 1 e 2), 8 de plâncton (ponto 1 e 2) e 4 de bivalves.

Figura 9 – Localização dos pontos de amostragem em São Sebastião, S. P.

4.1.3 Ubatuba

O município de Ubatuba faz divisa com o Estado do Rio de Janeiro, estando a 226 km de São Paulo. Possui uma área de 711 km², sendo o maior município do litoral norte. A proximidade da Serra do Mar em relação ao Oceano Atlântico, faz com que a planície costeira seja estreita e os espigões avancem na costa que se apresenta recortada com pequenas baías e enseadas. Apresenta ainda um total de 78 praias, com 53 km de extensão. A vegetação predominante é a Mata Atlântica, sendo este um dos locais onde ela está mais preservada. É o município com maior índice pluviométrico da região, com médias mensais que variam de aproximadamente 88 mm em junho a 300 mm em fevereiro. Da área do município, 52,08 km² pertencem ao Núcleo Picinguaba do Parque Estadual da Serra do Mar. Ubatuba é mais ocupado em sua porção sul, onde se encontram as principais praias (CETESB, 2008).

A população fixa é de 64.778 e a flutuante de 85.616 pessoas, concentrada nos meses de verão. A taxa de crescimento anual de 1996 a 2000 foi de 4,8% representando um aumento de cerca de 20% no total da população residente. A densidade demográfica (extraindo-se a área do parque) é de 98 hab./ km² (FUNDAÇÃO SEADE, 2004).

As atividades econômicas estão voltadas principalmente para o turismo. O município tem grande potencial turístico, não só pelas praias, mas também pelas áreas preservadas de Mata Atlântica. Com relação ao saneamento básico, tem-se cerca de 22,8% da população atendida pela rede de esgotos (CETESB, 2008).

A Marina Píer do Saco da Ribeira é uma marina pública, administrada pela Fundação Florestal, com serviços de garagem náutica, atracação para carga e descarga, pesca e transporte para o Parque Estadual da Ilha Anchieta, além de postos de abastecimento flutuantes para embarcações; abriga também uma base do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (CETESB, 2008).

Em Ubatuba o ponto 1 de amostragem estava localizado na latitude 23°30'02''S e Longitude 45°07'07'' e o ponto 2 na latitude 23°30'41'' e longitude 45°06'04'' (figura 10). As coletas ocorreram mensalmente durante o período de Fevereiro de 2006 a Junho de 2006, com exceção do mês de Abril, devido condições impróprias para navegação em decorrência do mal tempo. O total obtido foram 6 amostras de água (ponto 1 e 2), 6 de plâncton (ponto 1 e 2) e 3 de bivalves.

Figura 10 – Localização dos pontos de amostragem em Ubatuba, S. P.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2008.

4.1.4 Santos

Com área de 280 km², Santos destaca-se como um dos grandes centros urbanos brasileiros ocupando posição central na região da Baixada Santista, sendo a maior cidade do litoral paulista e o principal porto marítimo da América Latina. Localizada na porção leste da Ilha de São Vicente (além de seu trecho continental, que se estende desde o alto da Serra do Mar até o Canal de Bertiooga), está entre os dez municípios mais populosos do Estado de São Paulo, com cerca de 417.000 mil habitantes e taxa de crescimento anual pequena, em torno de 0,3%. A população flutuante da cidade, nos meses de verão está em torno de 78.116 pessoas (FUNDAÇÃO SEADE, 2004), sendo uma das menores do litoral, quando comparada com a população fixa. A densidade demográfica é alta e está concentrada na parte insular do município (CETESB, 2008).

Sete canais drenam a área da cidade voltada para o mar, com o crescimento desta, esses canais acabaram se transformando na principal fonte de poluição fecal das praias, em decorrência de inúmeras ligações irregulares de esgotos a eles (CETESB, 2008). O Canal de Santos tem cerca de 14 km de extensão, com profundidade média de 12 a 14 metros. A principal atividade nessa área é mantida pelo Porto de Santos que ocupa mais de 7 milhões de m². O Canal recebe a drenagem dos municípios de Cubatão, Santos e Guarujá, além do Canal de Bertiooga. É uma área intensamente impactada pela atividade portuária e pela presença, nas

adjacências, de parque industrial que envolve indústrias como a COSIPA, Ultrafertil e Dow Química, além de esgotos domésticos.

A baía de Santos tem cerca de 7 km de largura na parte central e 11 km na parte final, entre as Pontas de Itaipu a oeste e do Munduba a leste e uma profundidade média de 5 a 10 m. Ao norte, é delimitada pelas praias de Santos e São Vicente. Recebe águas do estuário de Santos e do estuário de São Vicente, constituindo-se numa área de mistura da água do mar com as águas continentais. Além da poluição causada pelo Porto de Santos e pelas indústrias da região de Cubatão carregada até a baía pelo canal do porto, outra fonte de poluição são os esgotos domésticos despejados tanto dos estuários quanto através do emissário submarino cuja saída do efluente está localizada a 4 km da costa, no centro da baía. Todos esses fatores fazem deste um local bastante impactado (CETESB, 2008).

O emissário submarino de Santos entrou em operação em 1979 e está localizado na praia José Menino, na cidade de Santos, São Paulo. Esse emissário tem capacidade para captar esgotos de uma população de até 1.322.100 pessoas, com vazão máxima de 7.267 L/s e encontra-se a uma profundidade de aproximadamente 10 m.

A orla marítima de Santos possui 7 km de praias urbanizadas e sem acidentes geográficos, com amplo jardim, considerado o maior jardim litorâneo do mundo. A cidade de Santos conta com boa infra-estrutura urbana, diferenciando-se da maioria das cidades litorâneas. Segundo a SABESP, existe um total de 56.021 ligações de esgotos, sendo atendida cerca de 95% da população da cidade (CETESB, 2008).

Em Santos o ponto 1 de amostragem estava localizado na latitude 23°98'56''S e longitude 46°37'10'', em São Vicente, o ponto 2 na latitude 24°02'25'' e longitude 46°32'83'', na boca da Barra, após Ilha das Palmas e o ponto 3 na latitude 23°98'62''S e longitude 46°31'33'', no farol abandonado, em frente ao canal 6 (figura 11). A coletas ocorreram mensalmente durante o período de Fevereiro de 2006 a Junho de 2006, e o total obtido foram 12 amostras de água (ponto 1, 2 e 3), 12 de plâncton (ponto 1, 2 e 3) e 4 de bivalves

Figura 11 – Localização dos pontos de amostragem em Santos, S. P.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2008.

4.2 Regiões portuárias brasileiras

Sete portos da costa brasileira foram selecionados cada qual com seis pontos de amostragem, que foram determinados de acordo com o grau de impacto antrópico como saneamento, presença de pescadores, fábricas, terminais de passageiros, entre outros. Os portos selecionados foram: Belém (PA), Rio Grande (RS), Fortaleza (CE), Sepetiba (RJ), Paranaguá (PR), Recife (PE) e Santos (SP).

4.2.1 Porto de Belém (PA)

O Porto de Belém (figura 12) foi inaugurado em 02 de outubro de 1909 e está situado a uma distância de 120 km do oceano Atlântico. Sua localização é na margem direita da baía de Guajará. É um porto abrigado, praticamente isento de ventos fortes. Suas coordenadas são: Latitude 01° 28'03'' S e Longitude 48° 29'18'' W.

Abrange a quase totalidade do território paraense, destacando-se a região centro-leste do estado, bem como o extremo norte de Goiás e o sudoeste do Maranhão. A principal entrada marítima do Porto de Belém está situada entre a ilha do Fortim e a barra. O acesso é através de um canal, o Oriental, com 90 a 180 metros de largura média, 6.000 metros de comprimento e 9,00 metros de profundidade, quando dragado. A temperatura média anual no local do porto

é de 25,7°C, com umidade relativa de 84, 2%, precipitação de 2.800 mm, altura média das águas em preamar é de 3,22 m e de baixa-mar de 2,42 m.

Figura 12 – Vista panorâmica do porto de Belém (PA).

FONTE: ANTAQ, 2008.

Atualmente o Porto de Belém movimenta 1.000.000 toneladas de cargas por ano, sendo que as principais são: madeira, pimenta, palmito, peixe, camarão, castanha-do-pará e trigo (ANTAQ, 2008).

Figura 13 - Pontos de coleta no porto de Belém (PA): Ponto 1 – Início área do Porto junto ao Ver-o-peso; Ponto 2 – Altura Doca 6; Ponto 3 – Altura Doca 8; Ponto 4 – Altura Doca 11; Ponto 5 - Ponto final do Porto - saída de um canal de esgoto; Ponto 6 -

Ponto médio da área do Porto a uma distância de aproximadamente 1500 metros do cais.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2008.

As amostras de água e plâncton foram coletadas no dia 10/09/2002 no período de alta maré (às 13h32min - 3,6 m) a 200 m de distância dos cais (pontos 1 a 5) e o ponto 6 foi coletado a 1.500 m de distância do cais (figura 13). No total foram coletadas 6 amostras de água da região portuária e 6 de plâncton.

4.2.2 Porto de Rio Grande (RS)

Figura 14 – Vista panorâmica do Porto de Rio Grande (RS).

FONTE: ANTAQ, 2008.

O início da construção do Porto Velho do Rio Grande data de 1869 e sua inauguração aconteceu em 11 de outubro de 1872. Em 2 de junho de 1910, começou a implantação do Porto Novo, que entrou em operação em 15 de novembro de 1915 (ANTAQ, 2008).

Situado a 32° 07'20" de latitude Sul e a 52° 05'36" de longitude Oeste de Greenwich, é o porto de mar mais meridional do Brasil, localizado na margem Oeste do Canal do Norte, que é o escoadouro natural de toda a bacia hidrográfica da Laguna dos Patos.

A temperatura média é de 18°C, com umidade relativa do ar de 81% e pluviosidade de 112 dias/ano, distribuídos nos 12 meses. As variações de marés são de pequena amplitude e influenciadas pelos ventos, sendo a mínima de 0,30m, a máxima de 1,50m, com média de 0,50m. Os canais de acesso são o do Porto Novo que tem comprimento de 5,1km, largura de 150m e profundidade de 8,5m e o do Superporto se estende por 4,7km, com largura mínima de 200m e profundidade de 13m.

No ano de 2000 o porto movimentou no cais 13.805.097 toneladas de cargas e, fora do cais 67.377 t, que responderam, respectivamente, por 99% e 1% do total do porto, 13.872.474 t. Em 2007 movimentou 15.153.528 t e de janeiro a julho de 2008, o porto embarcou e desembarcou 15.892.145 t. Os embarques obtiveram o maior volume, confirmando a vocação de porto exportador, com uma movimentação de 10.300.900 toneladas, crescimento de 1,8%. Os desembarques seguiram a tendência e registrou um acréscimo de 10,9% nas operações, com 5.591.245 toneladas (ANTAQ, 2008).

Figura 15 - Pontos de coleta no porto de Rio Grande (RS): Ponto 1 - bóia 10; Ponto 2 – Tecon - terminal de contêineres; Ponto 3 - entre Ceval & Bianchini; Ponto 4 - Adubos Trevo; Ponto 5 - emissário curto/bóia 2; Ponto 6 - em frente da Pescal.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2008.

As amostras de água e zooplâncton foram coletadas no dia 04 de outubro de 2002. A maré alta estava prevista para às 17:43 horas (0,6 m), entretanto como a diferença de maré não era muito significativa as coletas foram realizadas ao meio dia. As amostras foram coletadas de 100 até 500 metros de distância dos cais. No total foram coletadas 6 amostras de água (figura 15) da região portuária, 6 amostras de plâncton e 1 de bivalves.

4.2.3 Porto de Fortaleza (CE)

As obras do antigo porto de Fortaleza foram iniciadas 17 de dezembro de 1920. A sua construção ficou a cargo da empresa Norton Griffiths, porém, o desenvolvimento dos trabalhos, iniciados em 1921, foi interrompido em 1923. Decorridos dez anos, o governo do Estado do Ceará, pelo Decreto nº 23.606, de 20 de dezembro de 1933, recebeu o porto em concessão e, em 1938, o Decreto-Lei nº 544, editado em 7 de julho, previu a transferência das instalações para um novo local (ANTAQ, 2008).

Figura 16 – Vista panorâmica do Porto de Fortaleza (CE).

O Porto de Fortaleza situa-se na enseada de Mucuripe, na cidade de Fortaleza, capital do Estado do Ceará. Está limitado a norte e a leste pelo Oceano Atlântico, tendo a cidade de Fortaleza a sul e a oeste. É um porto marítimo localizado na Latitude Sul a 3° 41'28" e Longitude 38° 33'29". Sua área de influência engloba todo o estado do Ceará e o oeste do Rio Grande do Norte.

Seu canal de acesso tem comprimento de 1.000 m, largura de 100 m e profundidade média de 10 m. A amplitude do mar têm variação máxima de 2,60m, com nível médio de 1,39 m e variação diária média de 2,00 m. Seu cais acostável tem comprimento de 1.054 m, com profundidade mínima de 3,60 m e máxima de 10,00 m. A maré preamar média de sizígia é de 2,82 m, a de quadratura de 2,20 m e o nível médio é de 1,55 m. A precipitação anual é de 1.462,3 mm e a movimentação de cargas acumulada no período de Janeiro a Dezembro/2002 foi de 3.449.524t (ANTAQ, 2008).

As amostras de água e plâncton foram coletadas no dia 13 de setembro de 2002 no período de maré alta, às 09h32min (2,4 m) a 500 metros de distância do cais em todos os pontos de coleta (figura 17) e o total obtido foram 6 amostras de água portuária, 6 de plâncton e 1 de bivalves.

Figura 17 - Pontos de coleta no porto de Fortaleza (CE): Ponto 1- Volta da Jurema; Ponto 2 – Mucuripe; Ponto 3 - em frente ao hotel com saída de esgoto; Ponto 4 - Armazém 2; Ponto 5 - Armazém 4; Ponto 6 - Praia Mansa.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2008.

4.2.4 Porto de Paranaguá (PR)

Figura 18 – Vista panorâmica do porto de Paranaguá (PR).

FONTE: ANTAQ, 2008.

A construção do porto de Paranaguá começou em 24 de novembro de 1926, e a sua inauguração foi em 17 de março de 1933. É composto por um cais de 2.616 m de comprimento e um cais de inflamáveis com dois piers sendo um com 143 m e outro com 184 m, possui área total de 71.500 m², com a profundidade do cais variando de 8 a 12 m (ANTAQ, 2008).

Está situado na cidade de Paranaguá, no Estado do Paraná, na margem sul da baía de Paranaguá e sua área de influência compreende o Estado do Paraná e parte dos Estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Inclui também o Paraguai, que dispõe de um entreposto franco no porto. Suas coordenadas geográficas são 48°30'10" de longitude e 25°31' de Latitude. A barra de entrada do seu canal de acesso marítimo tem largura de 200m e profundidade de 12m. O porto possui três canais de acesso: o do Norte, o do Sudeste e o da Galheta, sendo este último o principal, com 28,5 km de extensão, largura variando de 150 m a 200 m e profundidade de 12 m.

O porto de Paranaguá movimentou em 2002 no cais público, 27.859.879 t de cargas. As principais cargas embarcadas são açúcar, farelos, milho, soja, combustíveis para navios, derivados de petróleo, óleos vegetais, água para navios, produtos químicos, algodão, café, celulose, cerâmica, congelados, couros, madeira e papel, e as importadas são algodão, celulose, papel, arroz, cevada, fertilizantes, óleos vegetais, derivados de petróleo, produtos químicos, álcool, trigo e minério.

Figura 19 - Pontos de coleta no porto de Paranaguá (PR): Ponto 1- frente igreja; Ponto 2- Frente Sadia e Armazém 5; Ponto 3- Armazém 12 e 13; Ponto 4 - Armazém 16; Ponto 5 - Farolete Ponta da Cruz; Ponto 6 - Ponta do Caju.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2008.

Foram coletadas amostras de água de mar em seis pontos (figura 19), nos meses de fevereiro, março e abril de 2003, estando o ponto 1 localizado a 40 metros de distância do cais, os pontos 2, 3, 4 e 5 a 400 metros do cais e o ponto 6 a 100 metros do cais. Foram coletadas também amostras de bivalves na Vila Guarani, que está localizada próxima ao mangue e lança esgoto *in natura*, no ambiente aquático em torno do porto.

No total foram coletadas 18 amostras de água da região portuária, 18 de plâncton e 3 amostras de bivalves.

4.2.5 Porto de Recife (PE)

Figura 20 - Vista panorâmica do porto de Recife (PE).

FONTE: ANTAQ, 2008.

Desde 1815 foram registradas as primeiras iniciativas para a realização de melhoramentos no antigo ancoradouro do Recife, entretanto somente em 1º de julho de 1909, com a publicação do Decreto nº 7.447, a empresa Societé de Construction du Port de Pernambuco foi autorizada a construir as novas instalações, compreendendo, 2.125 m de cais e três armazéns, com a entrada em operação comercial em 12 de setembro de 1918.

O porto de Recife localiza-se na parte Leste da cidade do Recife, capital do estado de Pernambuco, na confluência e às margens dos rios Capibaribe e Beberibe, onde deságuam no Oceano Atlântico. Abrange os estados de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, parte de Alagoas, a faixa litorânea de Sergipe, o sudeste do Piauí, o sul do Ceará e o noroeste da Bahia. As coordenadas geográficas são latitude Sul 08°03'22" e longitude Oeste 34° 51' 57", a temperatura média do ar é de 25,6° C, com umidade relativa de 90% e índice médio de precipitação de 2272,9 mm. A variação média de maré de sizígia preamar é de 2,60 m, a de quadratura é de 1,60 m e a média de altura é de 1,12m.

Existem dois canais de acesso ao Porto, o principal deles, canal Sul, possui aproximadamente 260 m de largura e 3,4Km de extensão, com profundidade de 10,5 m. O outro, denominado canal Norte, tem cerca de 1.000 m de comprimento, e profundidade de 6,5 m, e é utilizado apenas por embarcações de pequeno porte.

O porto de Recife movimentou no cais público em 2002, 1.529.506 t de cargas. Em 2003 o fluxo de cargas totais foi de 2.394.505 t e em 2007 foi de 2.385.743 t.

Foram realizadas quatro coletas de amostras de água e plâncton nas seguintes datas: 16/09/2002, 10/02/2003, 12/03/2003 e 01/04/2003 durante a maré alta, em seis pontos de coleta (figura 21). Nas mesmas datas foram coletadas amostras de bivalves nas regiões próximas à área do porto. No total foram coletadas 24 amostras de água de região portuária, 24 de plâncton e 6 de bivalves

Figura 21 - Pontos de coleta no porto de Recife (PE): Ponto 1 – Frente à fábrica de pescado; Ponto 2 - Armazém 16; Ponto 3 - Rio Capivari, Final Armazém 14; Ponto 4 – Entre Armazéns 4 e 5; Ponto 5 – ao lado do Armazém 1, Rio Beberi; Ponto 6 - entre Arrecifes.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2008.

4.2.6 Porto de Santos (SP)

O porto de Santos está localizado no centro do litoral do Estado de São Paulo, estendendo-se ao longo de um estuário limitado pelas ilhas de São Vicente e de Santo Amaro, com 2 km de distância do oceano Atlântico. Sua área de influência compreende o Estado de São Paulo e grande parte de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e Paraná.

O porto de Santos foi inaugurado em 2 de fevereiro de 1892, Possui área total em metros quadrados de 7.700.000, com 64 berços, com cais acostável de 11.042 m de extensão e profundidades variando entre 6,6 m e 13,5 m; 521 m de cais para fins especiais, com profundidade mínima de 5m, e 1.883 m para uso privativo, com profundidades de 5 m a 11 m.

Figura 22 – Vista panorâmica do porto de Santos (SP).

FONTE: ANTAQ, 2008.

O acesso é amplo, contendo um canal com largura de 130 m e profundidade de 13 m, na parte marítima da baía de Santos, e, no estuário, largura de 100 m e profundidade de 12 m.

Suas coordenadas geográficas são latitude 23° 53' S e longitude 46° 19' W, com temperatura média de 20°C, umidade relativa de 82% e índice pluviométrico de 300 mm. A variação média de maré alta é de 1,7 m e de maré baixa é de 0,5 m.

O movimento anual de cargas em 2003 foi de 60.077.073 t e em 2007 foi de 80.775.867 t, um aumento de 34,45%, e as principais mercadorias movimentadas foram açúcar, café, sucos cítricos, soja em grão, farelos, álcool, trigo, sal, fertilizante, carne, óleo diesel e milho.

Foram realizadas 4 coletas nos meses de outubro de 2002 e fevereiro, março e abril de 2003. O ponto 1 estava localizado a 3.700 metros de distância da costa, o ponto 2 a 1400 metros, o ponto 3 a 100 metros, o ponto 4 a 130 metros e os pontos 5 e 6 a 300 metros (figura 23). No total foram coletadas 24 amostras de água da região portuária, 24 de plâncton e 8 amostras de bivalves.

Figura 23 - Pontos de coleta no porto de Santos (SP): Ponto 1 – Próximo à saída do emissário; Ponto 2 – Próximo a bóia 5; Ponto 3 – Terminal pesqueiro/Ferry; Ponto 4 - Bóia Teffé; Ponto 5 – Em frente ao armazém 3/Ilha de Barnabé; Ponto 6 – saída do rio pesqueiro.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2008.

4.2.7 Porto de Itaguaí (RJ)

Figura 24 - Vista panorâmica do Porto de Itaguaí (RJ).

FONTE: ANTAQ, 2008.

O Porto de Itaguaí foi inaugurado no dia 7 de maio de 1982, com a operação dedicada para descarga de alumina para a Valesul e de carvão para a CSN. Está localizado na costa norte da baía de Sepetiba, em Itaguaí, a 80 km do Rio de Janeiro, ao sul e a leste da Ilha da

Madeira. Sua área de influência abrange os Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e o sudoeste de Goiás (ANTAQ, 2008).

O canal de acesso (Carta 1623), estende-se desde a Ponta dos Castelhanos na Ilha Grande e a Ponta do Arpoador na Restinga de Marambaia por cerca de 22 milhas com profundidade média de 22 m e variando entre 300 m e 180 m de largura. Se considerarmos como referencial a Ilha Guaíba o canal se estenderá por 12 milhas com largura variando entre 200 m e 180 m e 15 m de profundidade mínima, através do canal sul de Martins (ANTAQ, 2008). Possui área de cais de uso público dividido em cais de multiuso com 810 m de comprimento, faixa de 32 m de largura, retroárea de 200.000 m², com três berços de atracação, sendo um deles descontínuo, em dolphins, todos com 270 m de comprimento e 14,5 m de profundidade, um píer de carvão, com 540 m de comprimento, 39,25 m de largura, dotado de dois berços de atracação em cada face e profundidade de 15m, no lado sul, e 12m, na face norte, e um píer de minério dotado de berço de atracação descontínuo, em dolphins, medindo 320m de comprimento. Suas coordenadas geográficas são latitude 22° 55' 9" S e longitude 43° 50' 5" W (ANTAQ, 2008).

A coleta foi realizada no dia 19 de setembro de 2002, com maré alta às 13: 28 horas (1,5 m). As amostras foram coletadas a uma distância de 200 até 1000 metros do cais. No total foram coletadas 6 amostras de água da região portuária, 6 de plâncton e 2 de bivalves.

Figura 25 - Pontos de coleta no porto de Itaguaí (RJ): Ponto 1- Próximo à Praia Coroa Grande; Ponto 2- Entre a Ilha do Gato e Ilha da Madeira; Ponto 3- Praia do Inglês/Ilha da Madeira; Ponto 4- Frente Tecon; Ponto 5 – Em frente a Galpão/Local Institucional; Ponto 6 - Frente à saída de esgoto/entrada do Porto.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2008.

4.3 Tanques de Lastro de Navios

Através do projeto intitulado: “Estudo exploratório de espécies exóticas em água de lastro em portos selecionados no Brasil”, realizado em parceria com a Gerência Geral de Portos, Aeroportos, Fronteiras e Recintos Alfandegados (GGPAF)/ ANVISA., foram selecionados 15 portos em nove Estados da costa brasileira para a coleta de amostras de água e plâncton do lastro de navios atracados. Assim, fizeram parte do projeto navios que atracaram nos portos de Belém (PA), Fortaleza (CE), Recife e Suape (PE), Aratu e Salvador (BA), Ponta Ubu, Praia Mole, Tubarão e Vitória (ES), Itaguaí e Rio de Janeiro (RJ), Santos (SP), Paranaguá (PR) e Rio Grande (RS).

As coletas foram realizadas de outubro de 2001 a março de 2002 e nos meses de setembro e outubro de 2002.

4.4 Amostragem

4.4.1 Água de regiões portuárias brasileiras e região costeira do Estado de S. Paulo

As amostras de água foram coletadas 10 centímetros abaixo da superfície em frascos de polipropileno estéreis (figura 26). Em Santos, Ubatuba e São Sebastião foram 5 litros de água de mar em cada ponto, no caso dos portos selecionados foi coletado 1 litro de água da região portuária em cada ponto selecionado. No momento da amostragem foram determinados os seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura, pH, salinidade e condutividade utilizando o aparelho de multiparâmetros (Hach).

Figura 26 - Coleta de amostra de água de regiões portuárias brasileiras e região costeira do Estado de S. Paulo.

4.2.2 Água de tanques de lastro de navios.

Foi selecionado um tanque para coleta de água de lastro em cada embarcação, baseando-se na facilidade de acesso à abertura e na distância entre esta e a fonte de energia mais próxima, uma vez que foi utilizada uma bomba auto-aspirante, de ½ cavalo, com voltagem de 110 ou 220 V (dependendo da voltagem local) e com saída e entrada de 3/4 polegadas.

Os tanques amostrados foram os laterais superiores, pique tanque de proa ou de duplo fundo, pelos seguintes acessos: tubos de sondagem, elipse, agulheiros ou suspiros, conforme Souza *et al.* (2001). Em algumas coletas foi utilizada uma válvula de retenção, na entrada da mangueira, para facilitar a aspiração.

Para água de lastro a coleta foi realizada posicionando-se a mangueira na sub-superfície (figura 27) ou meia profundidade do tanque de lastro (aproximadamente 0,5 a 5 m). Para as análises físico-químicas, foram utilizados frascos de polietileno não esterilizados de 1 litro (diretamente da mangueira). A temperatura foi medida através de termômetro (Incoterm) e o pH por meio de fitas (Merck) no momento da coleta. Para as análises microbiológicas, utilizou-se frascos de polietileno esterilizados de 1 e de 5 litros (diretamente da mangueira).

Figura 27 - Coleta de amostra de água do tanque de lastro de navio.

4.2.3 Plâncton

As amostras de plâncton foram coletadas juntamente com as amostras de água (figura 28 a, b e c), no caso de Santos, Ubatuba e São Sebastião foi feito arrasto horizontal com rede de malha de 64 µm por um período de 5 minutos. Para os portos o plâncton foi coletado pela mesma metodologia por 10 minutos e à profundidade de 50 cm.

No lastro, as coletas de plâncton (figura 29) foram feitas nos mesmos navios e tanques nos quais as amostras de água de lastro foram coletadas. Foram filtrados de 100 a 400 litros de água de lastro através de uma peneira de PVC com malha de 100 μm .

O material retido foi colocado em frascos de 250 ml previamente esterilizados. Todos os frascos foram mantidos em gelo e enviados ao laboratório imediatamente para análise das amostras em até 24 horas após a coleta.

Figura 28 - Coleta de amostra de plâncton de água do mar. Arraste horizontal (a), Concentração das amostras (b), Armazenamento (c).

Figura 29 – Coleta de amostra de plâncton do lastro de navio.

4.2.4 Moluscos Bivalves

Cerca de 20 a 30 exemplares de cada amostragem de bivalves de Santos, São Sebastião e Ubatuba foram coletados na área costeira no entorno da área da coleta das amostras de água.

No caso dos portos, as amostras de bivalves (aproximadamente 30 exemplares) foram coletadas nas proximidades da área portuária após uma enquete realizada com os pescadores

da região sobre quais os tipos de bivalves presentes e o melhor local para coleta. A amostragem foi feita conforme a disponibilidade de espécies de bivalves em cada região portuária, não sendo possível coletar amostras de bivalves no Porto de Belém. As amostras foram enviadas sob refrigeração ao laboratório para análise em até 24 horas após a coleta. A identificação da espécie dos bivalves (figura 30) foi realizada pelo Dr. Flávio da Costa Fernandes do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, em Arraial do Cabo, no Estado do Rio de Janeiro, órgão pertencente à Marinha do Brasil.

As amostras foram transportadas sob refrigeração num período máximo de 24 horas ao laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP).

Figura 30 – Amostras identificadas de Moluscos Bivalves: Ostra (*Crassostrea rhizophorae*) (A); Mexilhão *Perna perna* (B); Berbigão (*Anomalocardia brasiliana*) (C).

4.3 Análises microbiológicas

4.3.1 Contagem de Vibrionaceae

4.3.1.1 Processamento da amostras de água do mar e de tanques de lastro

As análises das amostras de água foram realizadas pelo método de contagem em placa em profundidade (“pour plate”) (AMERICAN PUBLIC HEALTH ORGANIZATION, 1998) em duplicata, utilizando o meio de cultura recomendado por Simidu e Tsukamoto (1980), sendo semeados os volumes de 1 e 0,1 mL de amostra e com incubação a 20°C por 72 horas em jarra de anaerobiose com gerador de atmosfera de gases (Anaerobac – PROBAC, São Paulo).

Para as amostras de Santos, São Sebastião e Ubatuba a contagem também foi realizada pela técnica de semeadura em superfície (“spread plate”) e pela técnica de membrana filtrante,

com volumes de amostras de 1 mL e 20 mL respectivamente, ambas utilizando o meio de cultura ágar TCBS (APHA, 1998) para confirmar a eficiência do meio de cultura recomendado por Simidu e Tsukamoto. As placas foram incubadas a 20 °C por 24 horas.

4.3.1.2 Processamento das amostras de plâncton

Para todas as amostras coletadas foram pesados cerca de um grama de peso úmido do plâncton coletado e a seguir, homogeneizado com triturador de vidro. Foram realizadas diluições seriadas até 10^{-3} em água de diluição (APHA, 1998). Em seguida foi realizada a quantificação pelo método de contagem em placa em profundidade (“pour plate”), utilizando o meio de cultura Simidu e Tsukamoto. A incubação foi realizada como o item anterior.

4.3.1.3 Processamento das amostras de moluscos bivalves

Para todas as amostras coletadas, as valvas de cerca de 10 a 15 bivalves foram lavadas externamente e posteriormente abertas na câmara de fluxo laminar. Foram pesadas 10g do conteúdo interno dos bivalves, colocadas em sacos de plástico e homogeneizadas com 90 mL de água de diluição. Foram realizadas diluições até 10^{-3} . A contagem de vibrios nas três diluições foi realizada pelo método de contagem em placa em profundidade, utilizando o meio de cultura Simidu e Tsukamoto.

4.3.1.4 Leitura dos resultados

Todas as colônias características foram contadas e aproximadamente a raiz quadrada do número de colônias por placa, ou no mínimo 5 colônias, de cada metodologia e tipo de amostra analisada foram selecionadas e transferidas para tubos inclinados com ágar Simidu e ágar gelose de conservação e armazenadas para posterior identificação. As colônias isoladas também foram armazenadas em glicerol 60% e congeladas em freezer -70°C.

4.3.1.5 Determinação da qualidade microbiológica das amostras de água.

Para verificação da qualidade de todas as amostras de água coletadas, foram analisadas a contagem de coliformes termotolerantes (CT) e enterococos intestinais (EI) de acordo com as recomendações da APHA (1998), pelo método de membrana filtrante, com a utilização de

ágar M-FC (DIFCO) e ágar ME (DIFCO), respectivamente. Também foi analisada a contagem de bactérias viáveis marinhas (BVM), pela técnica de contagem em placa em profundidade (“pour plate”) (APHA, 1998) com utilização do ágar marinho (DIFCO), sendo semeados volumes de 1 e 0,1 mL de amostra em duplicata e incubação a 20 °C por 24 a 48 hs.

Para as amostras de água coletadas em Santos, Ubatuba e São Sebastião adicionalmente foi analisada a contagem de colifagos seguindo recomendações da APHA, 1998. No caso das amostras de água de lastro foi analisada adicionalmente, a contagem de *Clostridium perfringens* segundo as recomendações da APHA (1998), utilizando o ágar Triptona Sulfito Cicloserina (TSC) acrescido de emulsão de gema de ovo (OXOID) e a contagem de colifagos F-específicos, seguindo a metodologia 1602 descrita pelo Environment Protection Agency (2001), utilizando o meio Agar Triptona Soja (TSA) (OXOID) duas vezes concentrado acrescido de 2 mL de solução de ampicilina (1,5mg/mL).

4.3.1.6 Triagem bioquímica dos isolados presuntivos de vibrios

Os isolados presuntivos da família *Vibrionaceae* foram submetidos aos testes bioquímicos segundo as recomendações do “Bacteriological Analytical Manual” (BAM) da “U. S. Food and Drug Administration” (FDA) (1995) para triagem rápida do gênero *Vibrio* spp. As provas recomendadas foram arginina-glicose inclinada (AGS) e ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) para diferenciação presuntiva entre *Vibrio* e outros gêneros; tolerância a concentrações de sal (0, 1 e 3%), reação de oxidase e o teste de oxidação-fermentação em meio OF glicose semisólido com e sem anaerobiose. A incubação foi em temperatura ambiente (20-25°C) por 18-24 horas, exceto no caso do meio OF (até 72 horas) e na tolerância ao sal (48 horas).

4.3.1.7 Identificação das espécies V. cholerae, V. parahaemolyticus e V. vulnificus e de seus fatores associados à virulência pela reação em cadeia pela enzima polimerase.

4.3.1.7.1 Extração de DNA

Após triagem rápida dos isolados presuntivos do gênero *Vibrio* foi feita extração do DNA genômico, segundo a técnica descrita por Rivera *et al.* (1995a), sem utilização de fenol. A determinação da qualidade do DNA foi realizada por método de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 mM; EDTA 0,001M, pH 8,0), conforme

a metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989) e a concentração foi verificada através do espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc., USA).

4.3.1.7.2 Caracterização das espécies e dos fatores associados à virulência pela reação em cadeia pela enzima polimerase (Polimerase Chain Reaction - PCR).

Foram feitas reações para identificação das espécies *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* com os devidos iniciadores (primers) e condições de amplificação descritas na tabela 3. Também foram feitas reações para a verificação dos principais fatores associados à virulência de cada uma das três espécies.

Os iniciadores foram manufaturados pela empresa Bio-Synthesis (PROMEGA/BRASIL). As reações foram otimizadas para o volume final de 25 µL. Cada reação continha 5µL de tampão de reação 5X concentrado (1.5 mM MgCl₂) (PROMEGA, MADISON, WI), 2 µL de dNTPs 10mM (Roche/Perkin Elmer), 0,25 µL de GoTaq Polimerase (PROMEGA, MADISON, WI), 1 µL de cada primer e 1 µL do DNA extraído e padronizado com uma concentração final de 100 ng/µL. As amplificações foram feitas no termociclador Mastercycler Silver (EPPENDORF, HAMBURG, GERMANY), utilizando os parâmetros especificados na tabela 3. As amostras amplificadas foram corridas em gel de agarose a 1% e os fragmentos foram medidos mediante comparação com o marcador de peso molecular. No estudo foram incluídas cepas padrões ATCC de *V. cholerae* 14035 e *V. parahaemolyticus* 17802, e, cepas obtidas do Instituto Adolfo Lutz de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*.

4.3.1.8 Caracterização molecular pelas técnicas de BOX, ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences) e REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic).

4.3.1.8.1 BOX-PCR

A técnica foi realizada conforme Versalovic *et al.* (1991), com modificações. O BOX-PCR utilizou apenas um único iniciador, o BOX A1R (5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G- 3'). Cada reação foi realizada com um volume final de 25 µL que continha tampão de reação 5X concentrado (1.5 mM MgCl₂) (PROMEGA, MADISON, WI), 10mM de cada dNTP (Roche/Perkin Elmer), 0,125 µL da enzima GoTaq TM Polimerase (PROMEGA, MADISON WI), 2 µL de primer e 1 µL do DNA extraído e padronizado com uma

concentração final de 100 ng/μL. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação, com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos e em seguida uma extensão final a 72°C por 15 minutos.

4.3.1.8.2 ERIC-PCR

A técnica ERIC-PCR foi selecionada para verificação da similaridade entre os isolados e foi realizada de acordo com as recomendações de Versalovic *et al.* (1991) e Rivera *et al.* (1995b) com modificações, sendo utilizado somente o iniciador ERIC 2 (5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3') que foi manufaturado pela empresa Bio-Synthesis (PROMEGA, BRASIL).

O preparo da reação foi realizado conforme a reação para o BOX-PCR e as amplificações foram feitas no termociclador Mastercycler Silver (EPPENDORF), utilizando os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 92°C por 45 segundos, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 70°C por 10 minutos, com passo final de extensão a 70°C por 20 minutos.

4.3.1.8.3 REP-PCR

Para o REP-PCR foram utilizados os seguintes primers (Bio-Synthesis/Promega-Brasil): REP 1R (5' III ICG ICG ICA TCI GGC 3') e REP 2 (5' ICG ICT TAT CIG GCC TAC 3'), onde I é A ou C. Cada 25 μL de mistura da reação continha os mesmo componentes do ERIC-PCR, exceto os primers utilizados e suas quantidades utilizadas que foram 1 μL de cada.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 94°C por 1 m, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 m, anelamento a 35°C por 1 m e extensão a 72°C por 1 m e 30 s, com uma extensão final de 72°C por 5 m.

4.3.1.8.4 Eletroforese dos produtos

Todos os produtos das reações foram corridos em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X a 70 voltz por 2 horas e 30 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta, sendo os fragmentos amplificados medidos por comparação

com os marcadores de peso molecular. Os marcadores de peso molecular empregados foram λ Hind III (VJR) e 100bp Ladder (VJR).

Os produtos foram analisados com o programa BIONUMERICS versão 5.0 (APPLIED MATHS, BÉLGICA) e os dendogramas foram construídos pelo método de máxima parcimônia. O coeficiente Pearson de correlação foi utilizado para analisar as similaridades dos padrões de banda.

TABELA 3 – Relação dos iniciadores, tamanhos dos amplicons, ciclos e referências utilizadas para as reações de PCR.

Espécie	Sequência do iniciador (primer)	Tamanho amplicon	Ciclos	Nº Ciclos	Gene alvo/Referência
<i>V. cholerae</i>	prVC-F: 5'- TTA AGC STT TTC RCT GAG AAT G-3' prVCM-R: 5'-AGT CAC TTA ACC ATA CAA CCC G-3'	295 bp	94°C/1 min 60°C/1 min 72°C/1 min	30	região 16S-23S rRNA ISR (CHUN <i>et al</i> , 1999)
<i>ctxA</i>	94F: 5'- CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G-3' 614R: 5'- CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC-3'	564 bp	94°C/1 min 60°C/1 min 72°C/1 min	30	CT subunidade A (FIELDS <i>et al</i> , 1992)
<i>tcpA</i>	72F: 5'- CAC GAT AAG AAA ACC GGT CAA GAG-3' 477R: 5'- CGA AAG CAC CTT CTT TCA CGT TG-3' 647R: 5'- TTA CCA AAT GCA ACG CCG AAT G-3'	451 (El Tor) 620 (clássico)	94°C/1 min 60°C/1 min 72°C/1 min	30	TCP A (clássico e El Tor) (RIVERA <i>et al</i> , 2001)
<i>V. parahaemolyticus</i>	L-tl: 5'- AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG-3' R-tl:: 5'-GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC -3'	450 bp	94°C/1min 60°C/1min 72°C/1min		Gene-alvo da hemolisina termolábil (TANIGUCHI <i>et al</i> , 1985, 1986)
<i>TDH</i>	L-tdh: 5'- GTA AAG GTG TCT GAC TTT TTG AC-3' R-tdh:5'-TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC-3'	269 bp	94°C/30 s 58°C/30 s	35	gene <i>tdh</i> (NISHIBUCHI e KAPER, 1985)
<i>TRH</i>	L-trh: 5'- TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT-3' R-trh: 5'-CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G-3'	500 bp	72°C/1min 94°C/30 s 58°C/30 s 72°C/1min	35	gene <i>trh</i> (HONDA <i>et al</i> , 1991) (HONDA e IIDA, 1993)
<i>Vibrio vulnificus</i>	VV-1 (P1):5'-GAC TAT CGC ATC AAC AAC CG-3' VV-2R (P2): 5'- AGG TAG CGA GTA TTA CTG CC-3'	704 bp	94°C/30 s 60°C/30 s 72°C/1min	30	gene <i>vvhA</i> citolisina (LEE <i>et al</i> , 1997)
	Vv oligo 1: 5'- CGC CGC TCA CTG GGG CAG TGG CTG-3' Vv oligo 3: 5'- CGA ATC CTT GAA CAT ACG CAG C-3'	386 bp	94°C/1min 68°C/1min 72°C/1min	30	gene citolisina-hemolisina (BRAUNS <i>et al</i> , 1991)

4.3.1.9 Análise Estatística

As variáveis analisadas foram inicialmente confrontadas com a curva de Gauss (Curva Normal) através do teste de Kolmogorov-Smirnov (distância K-S) e classificadas em paramétricas e não paramétricas. Quando às variáveis foram paramétricas, estas foram descritas na forma de média e desvio padrão da amostra e realizado teste de análise de variância para medidas não repetidas (ANOVA) com pós-teste de Diferença Mínima Significante (LSD) ou Pós-teste de Tukey Modificado para comparação entre os diferentes grupos. Por outro, lado quando as variáveis eram não-paramétricas foram descritas na forma de mediana e percentis 25 e 75 e utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Diferença Mínima Significante (LSD) para comparação entre os diferentes grupos.

Foi considerado para todo o estudo risco alfa de 5% ($p \leq 0,05$) de cometer o erro tipo I. Para a análise da relação entre dois parâmetros foi utilizado o teste de correlação de Spearman com $p \leq 0,05$ e r entre 0 e 1.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização física, química e microbiológica das áreas estudadas.

5.1.1 Região costeira do Estado de São Paulo

Os parâmetros físico-químicos podem ser observados tabela 4. A variação da temperatura nos ambientes aquáticos estudados foi normal para época de verão, sendo que valores menores que 23°C foram observados somente em Santos (Baixada Santista) e valores acima de 28°C foram encontrados principalmente em Ubatuba (litoral Norte). O valor observado no teste ANOVA ($p=0,016$) demonstrou que existe pelo menos uma região com diferença estatisticamente significativa de outra em relação a este parâmetro. Isto foi comprovado pelo teste estatístico LSD, onde foi encontrada diferença significativa apenas entre Santos e Ubatuba ($p=0,006$). Os valores de pH foram normais para águas estuarinas e de plataforma, valores altos e baixos foram observados em Santos (litoral Sul), entretanto entre os três locais não houve diferença significativa ($p=0,777$) no teste ANOVA. Os parâmetros salinidade e condutividade também não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os locais, ($p=0,226$ e $p=0,206$, respectivamente) no ANOVA. Levando-se em conta as médias aritméticas dos valores de salinidade, São Sebastião e Ubatuba foram classificados como locais de águas salinas, e, Santos, classificado como local de águas salobras, de acordo com a resolução CONAMA 357/05.

Tabela 4 - Valores mínimos, máximos, médias aritméticas, desvio padrão e valores do teste ANOVA dos parâmetros físico-químicos obtidos de amostras de água coletadas na região costeira do Estado de São Paulo.

Local	N	Temperatura (°C)				Salinidade (‰)				pH				Condutividade (ms)			
		Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP
Santos	12	19,6	26,7	24,2	2,546	19,7	31,8	28,1	3,431	6,5	8	7,3	0,492	31,8	48,8	43,7	4,87
São Sebastião	8	24,2	28	26,4	1,408	19,3	35	30,7	5,175	7	8	7,3	0,518	33,2	50,2	45,5	5,451
Ubatuba	6	25,3	31,8	27,7	2,221	30,3	31,7	31	0,706	7	7,5	7,3	0,258	46,3	49,9	48,3	1,579
		ANOVA $p=0,016$				ANOVA $p=0,226$				ANOVA $p=0,777$				ANOVA $p=0,206$			

Nota: Abreviaturas:

N: Número total de amostras analisadas

DP: Desvio padrão

As medianas dos valores obtidos para os parâmetros microbiológicos podem ser observadas na figura 31, onde também fica evidente através da observação destas, o nível de atividade antropogênica em cada área, sendo Santos uma área com maior impacto e Ubatuba com menor grau de impacto, baseando-se na qualidade sanitária das mesmas pelas contagens dos microrganismos indicadores de contaminação fecal.

Figura 31 – Gráficos Box-plot obtidos das contagens de Bactérias Viáveis Marinhas (a), Coliformes Termotolerantes (b), Enterococos Intestinais (c) e (d) Colifagos em amostras de água coletadas na região costeira do Estado de São Paulo.

Legenda - BVM=Bactérias Viáveis Marinhas; CT=Coliformes Termotolerantes; EI=Enterococos intestinais; COL= Colifagos; UFC= Unidade Formadora de Colônia; UFP = Unidade Formadora de Placa de lise.

Tabela 5 – Frequência e mediana das contagens de vibrios nas amostras de água e plâncton da região costeira do Estado de S. Paulo por meio de cultura e método utilizado.

Local	N	Água						Plâncton	
		CP/AS (UFC/mL)		CS/TCBS (UFC/mL)		MF/TCBS (UFC/20 mL)		CP/P (UFC/g)	
		F	mediana	F	mediana	F	mediana	F	mediana
Santos	12	12	$3,4 \times 10^2$	12	$5,0 \times 10$	12	$6,7 \times 10^2$	11	$7,7 \times 10^4$
São Sebastião	8	8	$1,2 \times 10$	8	$2,0 \times 10$	8	$1,4 \times 10^2$	8	$1,3 \times 10^5$
Ubatuba	6	6	$2,0 \times 10$	6	$2,1 \times 10$	6	$2,4 \times 10^2$	6	$7,8 \times 10^4$

Nota: Abreviaturas:

N: Número de amostras

CP: Contagem em profundidade (Pour Plate)

AS: Agar Simidu-Tsukamoto

CS: Contagem em superfície (Spread Plate)

P: Plâncton

UFC: Unidade Formadora de Colônia

F: Frequência absoluta.

Figura 32 - Gráficos Box-Plot obtidos das contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* em ágar Simidu-Tsukamoto, pela técnica de contagem em profundidade em água (a) e em plâncton (b), no ágar TCBS pela técnica de contagem em superfície (d) e no ágar TCBS pela técnica de membrana filtrante,

coletadas na região costeira do Estado de São Paulo.

Legenda – CV= Contagem de membros presuntivos da família Vibrionaceae; P= plâncton; UFC= Unidade Formadora de Colônia; AS= ágar Simidu-Tsukamoto.

As frequências e medianas das contagens de bactérias presuntivas da família *Vibrionaceae* obtidas das amostras de água e plâncton da região costeira do Estado de São Paulo estão demonstradas na tabela 5. As frequências foram iguais entre os três locais, exceto em uma amostra de plâncton coletada em Santos onde não houve crescimento, entretanto as médias das contagens foram maiores na área de Santos, seguido de Ubatuba e por último São Sebastião.

Conforme demonstrado na figura 32, as contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* em Agar Simidu-Tsukamoto realizadas em amostras de plâncton foram maiores em até 4 escalas logarítmicas do que nas amostras de água processadas pelos três tipos de metodologia, principalmente na região de São Sebastião onde é possível observar uma grande diferença em relação aos dois tipos de amostras, entretanto não foi observado nenhum tipo de correlação entre os parâmetros estudados e a presença de vibrios. O número total de isolados obtidos de amostras de água e plâncton foi de 605, sendo 308 de Santos, 170 de São Sebastião e 127 de Ubatuba, destes somente permaneceram viáveis para triagem bioquímica 368 isolados.

5.1.2 Regiões portuárias brasileiras

Em todos os parâmetros físico-químicos (tabela 6) houve pelo menos uma região com diferenças estatisticamente significantes em relação às demais, demonstrando a alta diversidade entre os ambientes estudados. Os portos de Rio Grande e Belém foram os que apresentaram diferenças mais estatisticamente significativas em comparação aos outros em relação à temperatura e salinidade. O porto de Rio Grande (RS) também apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação aos demais portos em relação ao pH ($p=0,000$) no teste LSD. Em relação à condutividade, o porto de Fortaleza (CE), foi o que apresentou maiores diferenças estatisticamente significantes em relação aos demais portos (com $p=0,0001$ entre Recife-PE, Santos-SP e Paranaguá-PR, e $p=0,007$ entre Itaguaí-RJ, no teste LSD) apresentando maior semelhança de valores com os portos de Belém (PA) e Rio Grande (RS). Pela análise pontual dos portos de Belém e do Rio Grande em seis pontos de coleta ao longo do porto, que apresentaram salinidade entre 0 e 0,1‰ foi possível classificá-los como locais de água doce, entretanto esta classificação é somente indicativa, pois foi realizada

somente uma coleta, sendo necessário um número maior de amostragem para uma classificação definitiva. Com base na média aritmética do parâmetro salinidade entre os pontos de coleta, os demais portos foram classificados como locais de água salobra/salina apesar de existirem algumas variações entre estes.

Tabela 6 - Valores mínimos, máximos, médias aritméticas, desvio padrão e valores do teste ANOVA dos parâmetros físico-químicos obtidos de amostras de água coletadas em regiões portuárias brasileiras.

PORTO	N	Temperatura (°C)				Salinidade (‰)				pH				Condutividade (ms)			
		Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP
Santos (SP)	24	21	27	23,6	1,844	10,8	32,5	27	5,51	6,5	8,5	7,3	0,473	18,3	50,1	42,2	7,948
Paranaguá (PR)	18	16	35	25,8	5,677	16,8	27,4	23,9	4,698	6,5	8	7	0,401	27,3	42,6	35,6	10,398
Recife (PE)	24	23	29	26,4	1,56	8,2	34,9	30	6,555	7	7,5	7,25	0,257	14,1	52,7	46,5	9,371
Belém (PA)	6	29	30	29,5	0,548	0	0,1	0,02	0,041	NF	NF	NF	NF	80,5	313	124,6	92,467
Fortaleza (CE)	6	27	27	27	0	5,5	36,3	29,3	12,19	NF	NF	NF	NF	43,3	1.017	213	393,9
Rio de Janeiro (RJ)	6	22	23	22,5	0,548	30,8	32,6	31,6	0,732	NF	NF	NF	NF	50,6	54,3	52,6	1,388
Rio Grande (RS)	6	20	21	20,1	0,408	0	0,1	0,05	0,055	5,5	6	5,6	0,258	78,2	145,3	102,3	28,248
		ANOVA p=0,0001				ANOVA p=0,0001				ANOVA p=0,0001				ANOVA p=0,007			

Nota: Abreviaturas:

N: Número total de amostras analisadas

DP: Desvio padrão

Os valores das medianas obtidos para os parâmetros microbiológicos podem ser observados na figura 33.

De todos os portos analisados o que apresentou maior índice de contaminação fecal foi o porto de Belém (PA), seguido do porto de Fortaleza (CE) e Paranaguá (PR). Apesar da resolução CONAMA 357/05 não apresentar padrões microbiológicos para avaliação de águas doces destinadas à navegação, a concentração de Coliformes Termotolerantes (CT) no porto de Belém pode ser considerada muito elevada em quatro dos seis pontos ($2,0 \times 10^4$ UFC/100 mL). O único porto que não apresentou evidências de contaminação fecal foi o porto de Itaguaí (RJ), entretanto neste também foi realizada uma amostragem indicativa. Bactérias Viáveis Marinhas (BVM) também foram encontradas em altas densidades no porto de Belém, seguido pelos portos de Paranaguá (PR) e Santos (SP). BVM foram frequentes em todas as amostras, sendo o menor valor encontrado no porto de Fortaleza (CE).

As frequências e medianas das contagens dos membros da família *Vibrionaceae* estão demonstradas na tabela 7. A frequência das contagens foi ligeiramente maior na água do que

no plâncton, entretanto as médias das contagens foram maiores no plâncton em até 3 escalas logarítmicas.

Figura 33 - Gráficos Box-plot obtidos das contagens de Bactérias Viáveis Marinhas (a), Coliformes Termotolerantes (b) e Enterococos Intestinais (c) em amostras de água coletadas em regiões portuárias brasileiras.

Legenda - CT=Coliformes Termotolerantes; EI=Enterococos intestinais; BVM=Bactérias Viáveis Marinhas; UFC=Unidade Formadora de Colônia.

Os locais que apresentaram as menores contagens foram os portos de Itaguaí (RJ), Fortaleza (CE) e Rio Grande (RS), respectivamente. As contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* não apresentaram nenhum tipo de correlação entre os parâmetros físico-químicos ou microbiológicos estudados. No caso de isolados identificados como *Vibrio* spp. o único parâmetro onde foi possível a observação de uma correlação positiva foi o do indicador

fecal *Enterococos* intestinais ($p=0,005$ e $r=0,554$) e somente no porto de Paranaguá. Cepas identificadas pela PCR como Vp também apresentaram correlação positiva com a CVP ($p=0,004$ e $r=0,576$), também somente no porto de Paranaguá.

Tabela 7 - Frequência e mediana das contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* obtidas das amostras de água e plâncton coletadas em regiões portuárias brasileiras.

Local	N	CV/água (UFC/mL)		CV/P (UFC/g)	
		F	mediana	F	mediana
Belém (PA)	6	6	$6,0 \times 10^2$	6	$3,2 \times 10^4$
Fortaleza (CE)	6	6	$7,6 \times 10$	6	$8,2 \times 10^3$
Paranaguá (PR)	18	18	$9,2 \times 10^2$	17	$3,2 \times 10^5$
Recife (PE)	24	24	$5,4 \times 10^2$	22	$3,8 \times 10^4$
Rio de Janeiro (RJ)	6	5	$5,5 \times 10$	5	$4,3 \times 10^3$
Rio Grande (RS)	6	6	$1,4 \times 10^2$	6	$4,2 \times 10^4$
Santos (SP)	24	23	$3,6 \times 10^2$	24	$1,1 \times 10^5$

Nota: Abreviaturas:

CV: Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*

P: Plâncton

UFC: Unidade Formadora de Colônia.

Os valores de medianas das CV em água e no plâncton podem ser observados na figura 34.

Figura 34 - Gráficos Box-Plot obtidos das contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* em amostras de água (a) e plâncton (b) coletadas em regiões portuárias brasileiras.

Legenda – CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; P= plâncton; UFC= Unidade Formadora de Colônia.

O número total de isolados obtidos de amostras de água e plâncton foi de 290, sendo 110 de Santos (SP), 83 de Recife (PE), 68 de Paranaguá (PR), 11 de Belém (PA), 9 de Fortaleza (CE), 6 de Rio Grande (RS) e 3 de Itaguaí (RJ), destes somente permaneceram viáveis 68 para triagem bioquímica.

5.1.3 Tanques de Lastro de Navios

Todos os parâmetros físico-químicos (tabela 8) analisados nas amostras de água de lastro tiveram uma ampla variação de valores, provavelmente devido à grande diversidade de origem das embarcações e ao tipo de água utilizada como lastro. Ainda, as temperaturas apresentadas foram medidas no momento da coleta, refletindo a temperatura no tanque onde a água de lastro foi coletada. A salinidade das amostras coletadas variou de 0,2 a 39,5‰, demonstrando que foram utilizadas desde água doce até água salina oceânica para o lastreamento dos navios, ou seja, somente 34% das embarcações obedeceram a Resolução A.868(20) da IMO, que recomenda a troca da água dos tanques com água oceânica. Os valores dos parâmetros temperatura ($p=0,000$) e salinidade ($p=0,000$) apresentaram diferenças estatisticamente significativas em pelo menos um dos tanques de lastro amostrados, segundo o teste ANOVA. Os tanques que apresentaram maior diferença significativa estatisticamente em relação ao parâmetro temperatura foram amostrados no porto de Rio Grande (RS), com $p=0,000$ no teste LSD em relação a todos os demais locais de atracagem onde estes foram amostrados. Os tanques amostrados em navios atracados em Belém foram os que apresentaram maior diferença significativa em relação aos demais locais quanto ao parâmetro salinidade ($p=0,000$) no teste LSD para todos os locais, exceto os tanques de navios atracados em Fortaleza (CE) ($p=0,007$). Os valores dos parâmetros pH ($p=0,065$) e condutividade ($p=0,120$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tanques amostrados. As amostras coletadas em navios atracados no porto de Rio Grande (RS) foram as que apresentaram diferenças em valores de condutividade em relação às demais amostras coletadas nos outros portos.

As medianas dos valores obtidos para os parâmetros microbiológicos podem ser observadas na figura 35. BVM foram mais frequentes em amostras de tanques de lastro coletadas em navios atracados em Vitória (ES), com crescimento em 13 das 16 amostras, ou 81,25%, entretanto as maiores abundâncias médias foram observadas em amostras de lastro coletadas em Paranaguá (PR), com uma média de $1,6 \times 10^3$ UFC/ml.

Amostras de água de lastro provenientes de Salvador (BA) apresentaram menor frequência, com crescimento em 42,8% das amostras e também uma das menores abundâncias médias, com $2,1 \times 10^2$ UFC/ml. No geral, BVM estavam presentes em 71, 4% das 105 amostras analisadas.

Tabela 8 - Valores mínimos, máximos, médias aritméticas, desvio padrão e valores do teste ANOVA dos parâmetros físico-químicos obtidos de amostras de água coletadas em tanques de lastro de navios.

Locais de atracamento dos navios	N	Parâmetros físico-químicos															
		Temperatura (°C)				Salinidade (‰)				pH				Condutividade (ms)			
		Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP
Belém (PA)	9	28	35	30,4	1,126	1,9	34,9	16	14,497	6	7	6,8	0,372	5,7	55,7	26,49	22,356
Fortaleza (CE)	5	25	30	27,8	1,924	9,7	37,2	27,4	10,498	7	7,5	7,1	0,447	16,7	59,7	43,52	16,132
Paranaguá (PR)	18	22,5	27	25,2	1,251	4,6	39,5	32,8	7,662	6	7,5	7	0,32	8,7	61,9	51,4	11,493
Recife (PE)	9	27	32	29,3	1,691	17,7	36,9	31,8	7,439	6	8	7,2	0,565	29,2	58	49,73	10,754
Rio de Janeiro (RJ)	7	22	29	21,8	9,89	24,8	35,8	32,1	4,933	6	7	6,8	0,408	40	56,8	50,54	7,086
Rio Grande (RS)	10	19	23,5	21	1,554	0,2	36,6	29,3	10,667	6	8	7,1	0,789	44,6	470	93,71	132,287
Salvador (BA)	7	26	29	28	1,155	23,8	36,9	30,8	4,424	6,5	7	6,9	0,189	38,5	59,3	49,6	7,287
Santos (SP)	24	20	29	24,3	2,574	5,5	36,6	32,5	6,357	6	7	6,7	0,448	9,9	58,1	51,3	9,884
Vitória (ES)	15	20	31	25,4	3,603	19,5	36,5	31,5	5,583	6,5	7,5	7	0,183	31,6	56,2	49,41	8,463
		ANOVA p=0,00				ANOVA p=0,0001				ANOVA p=0,065				ANOVA p=0,120			

Nota: Abreviaturas:

N: Número total de amostras analisadas

DP: Desvio padrão

Os indicadores de contaminação fecal analisados neste estudo, como Colifagos F-específicos (presentes em 22,8% das amostras), Enterococos intestinais (19%), Coliformes termotolerantes (10,5%) e *Clostridium perfringens* (12,4%) não foram uma boa alternativa como indicadores da qualidade microbiológica da água de lastro devido sua baixa frequência nas amostras. Entretanto em tanques amostrados de navios atracados em Santos (SP), Vitória (ES) e Rio Grande (RS) foram verificadas correlações altamente positivas entre CT e CV (p=0,000 e r=0,935), positivas entre CFE e CV (p=0,017 e r=0,587), e positivas entre CT e CV (p=0,057 e r=0,651) e CP e CV (p=0,043 e r=0,682), respectivamente (figura 36).

Isto foi confirmado pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo que todas as amostras apresentaram diferenças estatisticamente significantes nas contagens destes indicadores entre as regiões de amostragem. Foi observada também uma maior frequência de enterococos intestinais do que coliformes termotolerantes em todos os tanques amostrados. Coliformes termotolerantes não foram detectados em amostras de água de lastro de navios atracados em Fortaleza, Rio de Janeiro, Salvador e Vitória, e, as maiores contagens foram observadas em amostras de navios atracados em Paranaguá. Enterococos intestinais não foram detectados também em navios atracados em Fortaleza, Rio de Janeiro e Santos, e, as maiores contagens foram em amostras coletadas em navios atracados em Rio Grande.

As frequências (tabela 9) das contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* nas amostras também teve ampla variação sendo maiores na água de lastro do que no plâncton, inversamente ao observado em amostras coletadas em regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de São Paulo, onde as maiores contagens foram observadas no plâncton. Devido à maioria das amostras apresentarem valores de medianas iguais a zero, foram levados em consideração os valores dos quartis superiores. Portanto, os maiores valores foram observados em amostras de plâncton, com diferença em uma escala logarítmica.

Tabela 9 - Frequência e valor do quartil superior das contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* obtidas das amostras de água e plâncton coletadas em tanques de lastro de navios.

Local	N	CV/A (UFC/ml)		CV/P(UFC/g)	
		F	P75	F	P75
Belém (PA)	9	2	8,0x10	2	4,7x10 ²
Fortaleza (CE)	5	1	<1	1	<1
Paranaguá (PR)	18	5	2,0x10 ⁰	5	1,5x10
Recife (PE)	9	4	1,3x10	3	2,0x10 ²
Rio de Janeiro (RJ)	7	4	3,0x10 ⁰	1	<1
Rio Grande (RS)	10	3	4,5x10	2	<1
Salvador (BA)	7	2	1,0x10 ⁰	1	<1
Santos (SP)	24	6	<1	3	<1
Vitória (ES)	15	6	1,0x10 ⁰	3	<1

Nota: Abreviaturas:

N: Número de amostras

CV: Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*

A: Água

P: Plâncton

UFC: Unidade Formadora de Colônia.

F: Frequência
P75= Percentil 75 ou quartil superior

A maior frequência de CV foi em tanques de lastros amostrados em Paranaguá (PR). Os valores de medianas das CV em água e no plâncton coletados em tanques de lastro de navios podem ser observados na figura 37. No total foram obtidos 181 isolados, sendo 99 viáveis de 105 amostras de água e plâncton do lastro de navios.

Figura 36 – Gráficos obtidos das análises de correlações positivas entre CV e CT em Santos (SP) (a), CV e CFE em Vitória (ES) (b), CV e CT e CV e CP em Rio Grande (RS) (c e d) em amostras coletadas em tanques de lastro de navios.

Legenda – CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; CT= Coliformes termotolerantes; CFE = Colifagos F-específicos; CP= *Clostridium perfringens*.

Figura 37 - Gráficos Box-Plot obtidos das contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* em amostras de água (a) e plâncton (b) coletadas em tanques de lastro de navios.

Legenda – CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; P= Plâncton; UFC= Unidade Formadora de Colônia.

5.1.4 Moluscos Bivalves

As amostras de bivalves que apresentaram as médias de contagens de bactérias presuntivas da família *Vibrionaceae* foram obtidas em São Sebastião, Paranaguá e Rio de Janeiro e a menor média foi em Fortaleza, conforme observado na tabela 10.

5.2 Identificação Bioquímica de Vibrios

Foram submetidos à triagem bioquímica recomendada pelo “Bacteriological Analytical Manual” (BAM) (1995) da FDA para o gênero *Vibrio* spp. (Anexo 1), um total de 616 isolados obtidos de amostras de água e plâncton coletadas em tanques de lastro de navios, e de amostras de água, plâncton e moluscos bivalves coletadas em regiões portuárias brasileiras e na região costeira do Estado de São Paulo (tabela 11). Destes, foram triados como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., 235 cepas, sendo a maioria provenientes de amostras de água.

Tabela 10 - Frequência e média das contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* obtidas em amostras de moluscos bivalves coletadas em regiões portuárias brasileiras e na região costeira do Estado de S. Paulo.

Local	N	Frequência	Média (UFC/g)
Santos (SP)	12	12	4,1x10 ⁴
Ubatuba (SP)	3	3	7,1x10 ⁴
São Sebastião (SP)	4	4	2,8x10 ⁵
Recife (PE)	6	4	4,9x10 ⁴
Paranaguá (PR)	3	3	2,4x10 ⁵
Rio de Janeiro (RJ)	2	2	1,1x10 ⁵
Rio Grande (RS)	1	1	2,9x10 ⁴
Fortaleza (CE)	1	1	7,6x10 ³
Total geral	32	30	

Nota: Abreviaturas:

UFC: Unidade Formadora de Colônia.

N: Número de amostras

Tabela 11 – Número de isolados submetidos à triagem bioquímica e número de cepas triadas como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., por tipo de amostra.

Local da coleta	Número de isolados			<i>Vibrio</i> spp.		
	Água	Plâncton	Bivalves	Água	Plâncton	Bivalves
Tanques de lastro de navios	83	16	0	34	7	0
Região portuária brasileira	29	39	19	21	21	14
Região costeira do Estado de S. Paulo	226	142	62	77	38	24
Total geral		616			235	

A distribuição dos isolados triados como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp. pode ser observada na figura 38, conforme o local de coleta da amostra.

Figura 38 - Distribuição dos isolados identificados como presuntivos para o gênero *Vibrio* spp. por local de coleta da amostra: (a) tanques de lastro de navios; (b) região portuária brasileira; (c) região costeira do Estado de S. Paulo.

5.3 Identificação pela PCR (Polimerase Chain Reaction) das espécies de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* e seus respectivos fatores associados à virulência.

Foram feitas as extrações do DNA genômico dos 235 isolados triados como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., com padronização de concentração final do DNA a 100 ng/μL. Depois de identificados como espécie foram submetidos a outras reações de PCR para verificação dos principais fatores associados à virulência característicos de cada espécie. O total geral pode ser observado na tabela, com 90 cepas identificadas como *V. parahaemolyticus* e 11 como *V. cholerae*. Não foi identificada nenhuma cepa como *V. vulnificus*. Os principais fatores associados à virulência de *V. parahaemolyticus*, o TDH e TRH, não estiveram presentes em nenhuma das 90 cepas identificadas testadas. Também os fatores CTX e TCP para *V. cholerae* não foram encontrados em nenhuma das 11 cepas identificadas.

Tabela 12 - Total geral de todas as cepas identificadas com *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* de água, plâncton e bivalves pela técnica de PCR separadas por locais de coleta e tipos de amostra.

Local da coleta	<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. cholerae</i>		
	Água	Plâncton	Bivalves	Água	Plâncton	Bivalves
Lastro de navios	3	2	0	3	0	0
Região portuária brasileira	12	10	5	0	0	1
Região costeira de S. Paulo	26	17	15	5	1	1
Total	41	29	20	8	1	2
Total geral		Total 90			Total 11

Figura 39 - Distribuição das cepas de *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* por local de coleta.

5.4 Tipagem molecular por BOX, ERIC e REP-PCR

Todos os 90 isolados identificados pela PCR como *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) e os 11 identificados como *V. cholerae* (Vc) foram submetidos à tipagem molecular pelas técnicas de ERIC, BOX e REP-PCR, além das demais 134 cepas triadas como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp.

Depois da normalização do gel os padrões de bandas foram submetidos à análise de agrupamentos sendo comparados os métodos baseados em bandas e baseado na curva densitométrica. As similaridades calculadas baseadas em bandas (utilizando o coeficiente de Dice e Jaccard) e baseadas na curva densitométrica (com a correlação de Pearson) foram comparadas utilizando o valor de porcentagem de similaridade obtido do agrupamento UPGMA. Para analisar o relacionamento entre as cepas a partir dos padrões de bandas obtidos pelas técnicas descritas foi observado que o coeficiente de correlação de Pearson foi mais eficiente, pois apresentou maior valor de similaridade e maior número de agrupamentos do que o coeficiente de Dice ou Jaccard. Assim, todos os dendogramas foram analisados utilizando-se o coeficiente de Pearson, com posição de tolerância de 1 %.

5.4.1 BOX-PCR

5.4.1.1 *Vibrio* spp.

Das 134 cepas triadas como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., 85 tiveram amplificação positiva de duas bandas ou mais pela técnica de BOX-PCR. O dendograma analisado (figura 41) nos permitiu observar que existe uma porcentagem de similaridade de 37,02% entre os todos os isolados. Foram identificados dois agrupamentos, um menor com 38,9% de similaridade, onde se encontravam agrupadas cepas provenientes da região costeira de São Paulo, e outro agrupamento maior com as demais cepas e todos os controles, com índice de 37,2% de similaridade e subdividido em diversos subagrupamentos. Também foi observada a presença de 8 agrupamentos com índice de similaridade maior que 70%. Os controles de *V. cholerae* ficaram bem distantes entre si e os de *V. parahaemolyticus* ficaram com 98,5% de similaridade.

Figura 40 - Gráfico MANOVA gerado pelo programa BIONUMERICS demonstrando a distribuição dos agrupamentos de *Vibrio* spp. obtidos pela técnica de BOX-PCR conforme o local de coleta.

Legenda – SA=Santos; SP=São Paulo; SS=São Sebastião; B=Belém; PA=Pará; U=Ubatuba; RE=Recife; PE=Pernambuco; P=Paranaguá; PR=Paraná; RG=Rio Grande; RS=Rio Grande do Sul.

Os agrupamentos tenderam a se formar de acordo com as regiões de coleta, sendo que amostras da região costeira do Estado de São Paulo tiveram uma maior tendência para se agruparem, principalmente Santos e São Sebastião, assim como as de regiões portuárias, independentemente se provenientes do plâncton, moluscos bivalves ou água, conforme pode ser observado no gráfico MANOVA (figura 40) gerado pelo programa BIONUMERICS versão 5.0 (Applied Maths, Bélgica).

Figura 41- Dendrograma gerado com a técnica de BOX-PCR de isolados triados como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp. obtidos em amostras coletadas em tanques de lastro de navios, das regiões portuárias brasileiras e região costeira do Estado de São Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da

região costeira do Estado de S. Paulo.

5.4.1.2 *V. parahaemolyticus*

As 90 cepas de *V. parahaemolyticus* (Vp) analisadas de amostras de água, plâncton e bivalves do lastro de navios, regiões portuárias brasileiras e região costeira de São Paulo tiveram amplificação positiva de no mínimo 2 bandas pela técnica de BOX-PCR. O dendograma analisado nos permitiu observar uma porcentagem de similaridade de 40,7% entre os todos os isolados de Vp. Foram identificados dois agrupamentos, um menor com 47,8% de similaridade, onde se encontravam agrupadas 2 cepas provenientes da região costeira de São Paulo. O outro agrupamento com índice de 49,1% de similaridade agrupava as demais cepas e os controles de Vp, e estava subdividido em diversos subagrupamentos. Os controles de *V. parahaemolyticus* ficaram com 98,5% de similaridade entre si. Os agrupamentos tenderam a se formar de acordo com as regiões de coleta, assim como no caso das cepas de *Vibrio* spp., independentemente se provenientes do plâncton, bivalve ou água, conforme pode ser observado no gráfico MANOVA (figura 42).

Figura 42 – Gráfico MANOVA gerado pelo programa BIONUMERICS demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vp obtidos pela técnica de BOX-PCR conforme o local de coleta.

Figura 43 - Dendrograma gerado com a técnica de BOX-PCR de cepas de Vp obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da

região costeira do Estado de S. Paulo.

5.4.1.3 *V. cholerae*

As 11 cepas de *V. cholerae* (Vc) analisadas de amostras de água, plâncton e bivalves do lastro de navios, regiões portuárias brasileiras e região costeira de São Paulo tiveram amplificação positiva de no mínimo 2 bandas. Foi possível observar um índice de similaridade de 53,8% entre todas as cepas de Vc (figura 44). Foram identificados dois agrupamentos, um com 55,7% que continha a maioria das cepas em diversos subagrupamentos, inclusive os controles e outro com 53,8% de similaridade contendo uma cepa obtida da água de São Sebastião (SP).

Figura 44 - Dendrograma gerado com a técnica de BOX-PCR de cepas de Vc obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da região costeira do Estado de S. Paulo.

Figura 45 - Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vc obtidos pela técnica de BOX-PCR conforme o local de coleta, de amostras de água de lastro e de água e bivalves de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de São Paulo

5.4.2 ERIC PCR

5.4.2.1 *Vibrio* spp.

Das 134 cepas triadas como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., 102 tiveram amplificação positiva de duas bandas ou mais pela técnica de BOX-PCR. O dendograma analisado nos permitiu observar que existe uma porcentagem de similaridade de 12,6% entre os todos os isolados. Foram identificados dois agrupamentos, um menor com 18,1% de similaridade, onde se encontravam agrupadas a maioria de cepas provenientes da região costeira de São Paulo, com duas cepas sendo de regiões portuárias brasileiras, e outro agrupamento maior com as demais cepas e todos os controles, com índice de 14,5% de similaridade e subdividido em diversos subagrupamentos. Também foi observada a presença de 23 agrupamentos com índice de similaridade maior que 70%. Os controles de *V. cholerae* ficaram bem distantes entre si e os de *V. parahaemolyticus* ficaram com 98,5% de similaridade. Os agrupamentos tenderam a se formar de acordo com as regiões de coleta, sendo que amostras da região costeira do Estado de São Paulo tiveram uma maior tendência

para se agruparem, principalmente Santos e São Sebastião, assim como as de regiões portuárias, independentemente se provenientes do plâncton, moluscos bivalves ou água, conforme pode ser observado no gráfico MANOVA (figura 46) gerado pelo programa BIONUMERICS.

Figura 46 - Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de *Vibrio* spp. obtidos pela técnica de ERIC-PCR conforme o local de coleta.

Figura 47 - Dendrograma gerado com a técnica de ERIC-PCR de cepas *Vibrio* spp. obtidas em de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água

de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da região costeira do Estado de S. Paulo.

5.4.2.2 *V. parahaemolyticus*

Das 90 cepas de Vp analisadas de amostras de água, plâncton e bivalves do lastro de navios, regiões portuárias brasileiras e região costeira de São Paulo 89 tiveram amplificação positiva de no mínimo 2 bandas. O dendograma analisado (figura 49) nos permitiu observar que existe uma porcentagem de similaridade de 15,4% entre todas as cepas de Vp. Foram identificados dois agrupamentos, um com 23,5% de similaridade, onde se encontravam agrupados a maioria das cepas e os controles de Vp e outro com 27,6% que está representado por dois subagrupamentos com amostras de cepas provenientes do plâncton de lastro isoladas em Belém e da água da região de Ubatuba. Os controles de Vp ficaram tiveram 98,5% de similaridade. Os agrupamentos tenderam a se formar de acordo com as regiões de coleta, sendo que amostras da região costeira de São Paulo tiveram uma maior tendência para se agruparem, assim como as de regiões portuárias, independentemente se eram provenientes do plâncton, bivalve ou água, conforme pode ser observado no gráfico MANOVA (figura 48). Entretanto, regiões que apresentaram maior poluição fecal também se agruparam (Santos, Recife e Paranaguá), demonstrando um perfil semelhante.

Figura 48 – Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vp obtidos pela técnica de ERIC-PCR conforme o local de coleta.

Figura 49 – Dendrograma gerado com a técnica de ERIC-PCR de cepas de Vp obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água

de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da região costeira do Estado de S. Paulo.

5.4.2.3 *V. cholerae*

Das 11 cepas de *V. cholerae* (Vc) analisadas de amostras de água, plâncton e bivalves do lastro de navios, regiões portuárias brasileiras e região costeira de São Paulo 10 tiveram amplificação positiva de no mínimo 2 bandas. Foi possível observar um índice de similaridade de 1,5% entre todas as cepas de Vc. Foram identificados dois agrupamentos, um com 36,8% que continha a maioria das cepas e os controles de Vc em diversos subagrupamentos e outro com 1,5% de similaridade contendo os somente uma cepa obtida de amostras de molusco bivalve coletado em Paranaguá (PR). Foram observados 4 agrupamentos com índice de similaridade maior que 70%.

Figura 50 - Dendrograma gerado com a técnica de ERIC-PCR de cepas de Vc obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de São Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da região costeira do Estado de S. Paulo.

Pelo gráfico MANOVA (figura 51) foi possível observar a alta diversidade das cepas de Vc obtidas no estudo, entretanto cada agrupamento foi característico de determinado local de coleta.

Figura 51 - Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vc obtidos pela técnica de ERIC-PCR conforme o local de coleta.

5.4.3 REP-PCR

5.4.3.1 *Vibrio* spp.

Das 134 cepas triadas como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., 69 tiveram amplificação positiva de duas bandas ou mais pela técnica de REP-PCR. O dendograma analisado nos permitiu observar que existe uma porcentagem de similaridade de 7,5% entre os todos os isolados. Foram identificados dois agrupamentos, um menor com 25,9% de similaridade, onde se encontravam agrupadas cepas provenientes de regiões portuárias brasileiras e uma da região costeira de São Paulo, e outro agrupamento maior com as demais cepas e todos os controles, com índice de 13% de similaridade e subdividido em diversos

subagrupamentos. Também foi observada a presença de 18 agrupamentos com índice de similaridade maior que 70%. Os controles de Vp ficaram bem distantes entre si. Os agrupamentos tenderam a se formar de acordo com as regiões de coleta, como observado nos outros dendogramas, independentemente se provenientes do plâncton, moluscos bivalves ou água, conforme pode ser observado no gráfico MANOVA (figura 52) gerado pelo programa BIONUMERICS, entretanto estes estavam mais próximos do que os obtidos pelas outras técnicas.

Figura 52 – Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de *Vibrio* spp. obtidos pela técnica de REP-PCR conforme o local de coleta.

Figura 53 - Dendrograma gerado com a técnica de ERIC-PCR de cepas *Vibrio* spp. obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de São Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água

de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da região costeira do Estado de S. Paulo.

5.4.3.2 *V. parahaemolyticus*

Das 90 cepas de *V. parahaemolyticus* (Vp) analisadas de amostras de água, plâncton e bivalves do lastro de navios, regiões portuárias brasileiras e região costeira de São Paulo 78 tiveram amplificação positiva. O dendograma analisado nos permitiu observar que existe uma porcentagem de similaridade de 5,8 % entre os todos os isolados de Vp. Foram identificados dois agrupamentos, um menor com 17,3 % de similaridade, onde se encontravam agrupadas em diversos subagrupamentos, cepas provenientes da região costeira e portuária de Santos (SP), de Recife (PE), Paranaguá (PR) e uma cepa proveniente de plâncton de lastro coletada em Belém. O outro agrupamento com as demais cepas e os controles possuía índice de 11,7 % de similaridade e estava subdividido em diversos subagrupamentos. Os controles de Vp ficaram bem distantes entre si. Os agrupamentos tenderam a se formar de acordo com as regiões de coleta, entretanto com esta técnica haviam agrupamentos formados por cepas de regiões distintas. Conforme pode ser observado no gráfico MANOVA (figura 54) existiu uma grande diversidade de cepas Vp com diferentes padrões de bandas, independentemente se provenientes do plâncton, moluscos bivalves ou água. Foram observados 16 agrupamentos com índice de similaridade maior que 70%.

Figura 54 - Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vp obtidos pela técnica de REP-PCR conforme o local de coleta.

Figura 55 - Dendrograma obtido com a técnica de REP-PCR de cepas de Vp obtidas em amostras de tanques de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da região costeira do Estado de S. Paulo.

5.4.3.3 *V. cholerae*

Das 11 cepas de *V. cholerae* (Vc) analisadas de amostras de água de tanques de lastro de navios e água, plâncton e moluscos bivalves de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de São Paulo, 8 tiveram amplificação positiva. Foi possível observar um índice de similaridade de 14,9 % entre todas as cepas de Vc. Foram identificados dois agrupamentos, um com 45,4 % com as cepas provenientes de tanques de lastro de navios atracados em Belém e um controle de Vc. E o outro com 37,8 % de similaridade contendo cepas provenientes da região costeira do Estado de São Paulo e outro controle de Vc. Foram observados 4 agrupamentos com índice de similaridade maior que 70%.

Figura 56 - Dendrograma obtido com a técnica de REP-PCR de cepas de Vc obtidas em amostras de tanques de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo, com índice de correlação de Pearson e 1% de posição de tolerância.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da região costeira do Estado de S. Paulo.

Figura 57 - Gráfico MANOVA demonstrando a distribuição dos agrupamentos de Vc obtidos pela técnica de REP-PCR conforme o local de coleta.

5.5 Comparação entre as técnicas BOX, ERIC e REP-PCR.

5.5.1 *Vibrio* spp

O dendograma gerado pelo programa BIONUMERICS (figura), que faz a comparação entre os três experimentos através da média de bandas entre eles demonstrou um índice de similaridade de 29,9% entre todas as cepas de *Vibrio* spp. Podem ser observados dois agrupamentos, um menor com 33,3% com cepas de São Sebastião e Santos provenientes das amostras de água, plâncton e moluscos bivalves e uma cepa de Rio Grande (RS) proveniente das amostras de água de tanques de lastro de navios. As demais cepas e os controles estavam no outro agrupamento com 30,2% de similaridade, subdivididas em diversos subagrupamentos. Os controles de Vp tiveram índice de similaridade de 85,7% e os de Vc de 62,9%. Foram observados 11 agrupamentos com índice de similaridade maior que 70%.

Figura 58 – Dendrograma obtido com comparação entre as técnicas de BOX, ERIC e REP-PCR de cepas de *Vibrio* spp. obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da região costeira do Estado de S. Paulo.

5.5.2 V. parahaemolyticus

O dendograma gerado pelo programa BIONUMERICS (figura 59), demonstrou um índice de similaridade de 31,1% entre todos os isolados de Vp. Podem ser observados dois agrupamentos, um menor com 36,6 % com cepas de Santos (SP), Paranaguá (PR) e Recife (PE) provenientes da água, plâncton e moluscos bivalves. As demais cepas e os controles estavam no outro agrupamento com 31,7 % de similaridade, subdivididas em diversos subagrupamentos. Os controles de Vp tiveram índice de similaridade de 86,7 %. Foram observados 17 agrupamentos com índice de similaridade maior que 70%.

5.5.3 V. cholerae

O dendograma (figura 60) demonstrou um índice de similaridade de 42,7 % entre todos os isolados de Vc. Podem ser observados dois agrupamentos, um com 47,6 % com cepas da região costeira do Estado de São Paulo e um controle de Vc. Cepas de Belém provenientes da água de lastro e outro controle estavam no outro agrupamento com 31,7% de similaridade. Os controles de Vc ficaram distantes entre si e somente 1 agrupamento com índice de similaridade maior que 70% foi observado.

Figura 59 – Dendrograma obtido com comparação entre as técnicas de BOX, ERIC e REP-PCR de cepas de Vp obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de S. Paulo.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da região costeira do Estado de S. Paulo.

Figura 60 - Dendrograma obtido com comparação entre as técnicas de BOX, ERIC e REP-PCR de cepas de Vc obtidas em amostras de tanques de lastro de navios, de regiões portuárias brasileiras e da região costeira do Estado de São Paulo.

Legenda - ALN= Água de tanques de lastro de navios; PLN= Plâncton de tanques de lastro de navios; AP= Água de regiões portuárias brasileiras; PP= Plâncton de regiões portuárias brasileiras; AC= Água da região costeira do Estado de S. Paulo.

6 DISCUSSÃO

6.1 Região costeira do Estado de São Paulo

Os ambientes marinhos e costeiros do Brasil vêm sofrendo nos últimos anos um considerável processo de degradação ambiental, gerado pela crescente pressão sobre os recursos naturais marinhos e continentais e pela capacidade limitada desses ecossistemas absorverem os impactos resultantes. A introdução de nutrientes, alteração ou destruição de habitats, alterações na sedimentação, superexploração de recursos pesqueiros, poluição industrial, principalmente de poluentes persistentes, e a introdução de espécies exóticas, constituem-se nos maiores impactos ambientais (GEOBRASIL, 2002).

O Estado de São Paulo, cortado pelo Trópico de Capricórnio em latitude aproximada de 23°21' Sul, encontra-se numa área de transição entre os Climas Tropicais Úmidos de Altitude, com estação seca bem definida, devido à menor ação de atividades frontais, e os Subtropicais, sempre úmidos pela intensa ação das frentes vindas do sul. O clima é bastante úmido, com médias de pluviosidade elevadas, em torno de 2000 mm anuais. A quantidade de chuva é um elemento particularmente importante, pois influencia diretamente a qualidade da água do mar. As chuvas podem carregar águas paradas com esgotos e água de pequenos córregos que recebem esgotos clandestinos. Esgoto, lixo e outros detritos, na ocorrência de chuvas, são carregados para as praias pelas galerias, córregos e canais de drenagem, produzindo, assim, um aumento considerável na densidade de bactérias nas águas litorâneas. Nos meses mais chuvosos a tendência é ter um maior número de praias impróprias para banho, coincidindo com os meses de verão, período de sensível aumento da população flutuante (CETESB, 2005). Esse contingente é significativo, principalmente nos meses de férias de verão e nos finais de semana e também pode influenciar na qualidade das águas da região.

Com relação às águas marinhas, a região do litoral paulista como um todo é caracterizada pela ação de duas grandes correntes marinhas: a Corrente do Brasil, quente, com temperatura superficial superior a 22° C, e a Corrente das Malvinas, fria, com temperatura superficial próxima a 16° C. Ambas condicionam os fenômenos físico-químicos e biológicos regionais, na interface dos sistemas continental e oceânico.

Águas recreacionais são águas doces, salobras e salinas destinadas à recreação de contato primário, sendo este entendido como um contato direto e prolongado com a água (natação, mergulho, esqui-aquático, etc.), no qual, a possibilidade do banhista ingerir

quantidades apreciáveis de água é elevada. O contato secundário refere-se àquele associado a atividades em que o contato com a água é esporádico ou acidental e a possibilidade de ingerir quantidades apreciáveis de água é pequena, como na pesca e na navegação. A qualidade da água para fins de recreação de contato primário constitui a balneabilidade, sendo necessário para sua avaliação o estabelecimento de critérios objetivos. Esses critérios devem estar baseados em indicadores a serem monitorados e seus valores confrontados com padrões preestabelecidos, para que se possam identificar as condições de balneabilidade em um determinado local; podem-se definir, inclusive, classes de balneabilidade para melhor orientação dos usuários (CETESB, 2008).

Do ponto de vista de saúde pública, é importante considerar não apenas a possibilidade da transmissão de doenças de veiculação hídrica aos banhistas (gastroenterite, hepatite A, cólera, febre tifóide, entre outras), como também a ocorrência de organismos patogênicos oportunistas, responsáveis por dermatoses e outras doenças como conjuntivite, otite e doenças das vias respiratórias. O parâmetro indicador básico para a classificação das praias, quanto à sua balneabilidade, é a densidade de bactérias fecais. Fatores circunstanciais, tais como a incidência de surtos epidêmicos de doenças de veiculação hídrica, derrame acidental de petróleo, ocorrência de maré vermelha ou floração de algas tóxicas poderão tornar, temporariamente, uma região do litoral imprópria para recreação de contato primário.

Em sua grande maioria, os municípios litorâneos paulistas são desprovidos de sistemas adequados para a coleta, tratamento e disposição final dos esgotos. A deficiência desses sistemas tem como consequência o lançamento direto ou indireto dos esgotos nos cursos d'água mais próximos, que acabam por afluir às praias. Com relação à fisiografia da praia, é importante ressaltar que enseadas, baías e lagunas apresentam condições de diluição bastante inferiores às observadas em regiões costeiras abertas. A menor taxa de renovação das águas dessas regiões contribui para a concentração dos poluentes, limitando, assim, a capacidade de diluição do meio receptor. Durante as marés de enchente, o grande volume de água afluyente, além de favorecer a diluição dos esgotos presentes nas águas das praias, age no sentido de barrar cursos d'água eventualmente contaminados. Já nas marés vazantes, ocorre o fenômeno inverso, havendo uma drenagem das águas dos córregos para o mar, levando maior quantidade de esgotos às praias (CETESB, 2008).

A legislação ambiental relacionada à qualidade das águas litorâneas é regulada principalmente por duas Resoluções Federais do Conama (Conselho Nacional do Meio Ambiente), a Resolução nº 274/2000 e a nº 357/2005. De acordo com a legislação ambiental

a classificação dos corpos hídricos é realizada através de classes, baseada nos usos da água, sendo estabelecidos padrões de qualidade para cada uma delas.

A poluição não atinge igualmente os municípios litorâneos paulistas, ela é regionalizada, de acordo com as atividades econômicas predominantes. O Litoral Norte é afetado principalmente pela falta de saneamento básico, responsável pela poluição dos cursos d'água locais e pela disposição de resíduos sólidos; derrames de óleos significativos, apesar de freqüentes, afetam principalmente a região próxima ao Canal de São Sebastião. O Litoral Sul é o menos afetado por poluição, resumindo-se também à falta de saneamento e disposição adequada dos resíduos sólidos. A região mais crítica é a Baixada Santista que além do saneamento básico insuficiente, em alguns municípios, abriga o maior porto da América Latina e um expressivo complexo industrial (CETESB, 2004).

O Estado de São Paulo possui duas áreas portuárias importantes: o Canal de São Sebastião e o Canal de Santos. O Porto de São Sebastião iniciou suas atividades em 1963 e desde 1993 é operado pela Dersa que responde como autoridade portuária em São Sebastião. Localizado a 200 km do município de São Paulo, movimenta em torno de 400 mil toneladas/ano. O Porto de Santos, inaugurado em 02 de fevereiro de 1892, é operado desde 1980 pela Cia. Docas do Estado de São Paulo (CODESP), e possui 12 km de cais entre as margens do estuário de Santos. Sendo um dos maiores portos do país, possui movimento anual em torno dos 70 milhões de toneladas de produtos variados, de produtos alimentícios aos industrializados e derivados de petróleo, tanto a granel quanto por contêineres (ANTAQ, 2008).

Neste trabalho foram incluídas três regiões do ambiente costeiro de S. Paulo que têm diferentes graus de influência antropogênica. A área de Ubatuba (litoral Norte), ecossistema preservado, pode ser considerada como uma área com atividade antropogênica mínima, sendo confirmado pelos resultados obtidos e de acordo também com os critérios de balneabilidade estabelecidos pela resolução CONAMA n°274 (2000), visto que não foi detectada a presença de et al.iformes termotolerantes (CT) e nem enterococos intestinais (EI), que são indicadores microbiológicos indiretos do grau de poluição. A outra área estudada, que foi a do canal de São Sebastião, pode ser considerada de atividade antropogênica média, pois existe atividade portuária neste canal e pode ser confirmada pela presença de concentrações mínimas de CT em 3 das amostras e de EI em uma amostra, apesar de estarem dentro dos padrões de balneabilidade, segundo resolução CONAMA. Finalmente a área de Santos, que demonstrou atividade antropogênica evidente segundo os resultados obtidos com as contagens de CT, que

se apresentaram fora dos padrões de balneabilidade, pois é uma área contaminada com despejo de esgoto doméstico e industrial, além da presença de atividade portuária intensa.

Foi observado que, independente da atividade antropogênica e do ambiente costeiro analisado, em todas as amostras foram detectadas bactérias presuntivas da família *Vibrionaceae*. Concentrações maiores em uma escala logarítmica foram obtidas em amostras coletadas em Santos (Baixada Santista), possivelmente devido às altas concentrações de matéria orgânica. A concentração de vibrios em amostras de água foi em alguns casos maior em até uma escala logarítmica quando utilizado o ágar recomendado por Simidu e Tsukamoto (1980) em comparação com as contagens obtidas utilizando ágar TCBS. Austin *et al.* (1979) fizeram estudo comparativo da flora bacteriana aeróbica e heterotrófica entre as Baías de Chesapeake e de Tóquio, utilizando o meio de cultura recomendado por Simidu, TCBS e ágar marinho e relataram abundâncias de $8,4 \times 10^1$ (Chesapeake) e $3,3 \times 10^1$ (Tóquio), $6,3 \times 10^2$ e $1,8 \times 10^1$, $2,0 \times 10^4$ e $9,1 \times 10^4$, respectivamente. Depois de diversos testes bioquímicos os autores concluíram que os meios TCBS e Simidu foram altamente seletivos para o gênero *Vibrio* spp, sendo o TCBS foi mais eficiente.

A contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* nas amostras de plâncton foram até 4 escalas logarítmicas maiores que as obtidas em amostras de água confirmando que os vibrios formam parte da microbiota de organismos planctônicos, independentemente da área estudada e portanto da atividade antropogênica presente na área. Esta fixação ao tegumento do copépode tem implicações ecológicas potenciais, pois estes podem contribuir para a transferência de espécies patogênicas através da cadeia alimentar porque são os principais constituintes da dieta de muitos carnívoros marinhos, incluindo peixes planctívoros, medusas e quetognatos (DUMONTET *et al.*, 1996). Está bem estabelecido que os vibrios são autóctones de ambientes aquáticos e que estes organismos não são introduzidos significativamente no ambiente marinho pelo despejo de esgoto ou água doce adjacente, conforme descrito em diversos trabalhos (MATTÉ *et al.*, 1994; CAVALLO E STABILI, 2002; LHAFFI E KÜHNE, 2007).

Diferentes sistemas seletivos são necessários no isolamento de *Vibrio* spp. para suprimir as populações microbianas características dos diferentes locais de amostras e alimentos. Bactérias não-fermentativas gram-negativas, Enterobacteriaceae e menos comuns *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Micrococcus* spp. são os mais frequentes competidores (DONAVAN E VAN NETTEN, 1995). O método de contagem em placa de vibrios foi considerado como presuntivo e para confirmar se as colônias crescidas no ágar pertenciam ao gênero *Vibrio* foram selecionadas pelo menos cinco colônias de cada placa em duplicata.

Os isolados identificados como Vc e Vp de amostras de água e plâncton dos três ambientes estudados não apresentaram nenhum dos principais fatores associados à virulência. *Vibrio vulnificus* não foi detectado nas amostras, talvez devido às exigências nutricionais da espécie que não puderam ser obtidas dos meios de cultura selecionados neste estudo, ou também porque possam estar no estado viável não-cultivável em maior frequência (BRAUNS *et al.*, 1991). O número de *V. vulnificus* (Vv) em amostras de água do mar é geralmente muito baixo, num estudo de mais de 6.000 amostras de água do mar e de águas de Tóquio Harbor, Aono *et al.* (1997) relataram que somente 0,2% de todos os isolados foram confirmados por PCR como Vv, e, em outro estudo realizado por Pfeffer *et al.* (2003) verificou-se que Vv representava cerca de 0,15% da população estuarina presente em seis locais no noroeste dos Estados Unidos. Entretanto, estes números crescem relativamente quando as contagens são feitas em amostras de bivalves e plâncton (OLIVER, 2006; HEIDELBERG *et al.*, 2002).

De 368 isolados viáveis, 115 (31,2%) cepas foram triadas bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., sendo 77 provenientes de amostras de água e 38 de amostras de plâncton. Destes, 43 foram identificadas como Vp *tdh/trh* negativos (26 provenientes de amostras de água e 17 de amostras de plâncton) e 6 como Vc *ctxA/tcpA* negativos (5 da água e 1 do plâncton). Em Santos foi observado o maior número de Vp, seguido de São Sebastião e Ubatuba, com 16, 15 e 12 cepas, respectivamente, entretanto em Ubatuba foram realizadas apenas três análises. Em um estudo feito por Macián *et al.* (2000) de identificação de *Vibrio* spp. em amostras de água do mar e mariscos na costa do Mediterrâneo da Espanha, observou-se que somente 5% das amostras foram identificadas como Vp.

Estudos baseados na análise direta da diversidade bacteriana em amostras ambientais através de métodos moleculares, sem a etapa de isolamento e cultivo, têm revelado um novo cenário sobre a distribuição de microrganismos no meio ambiente (CANHOS *et al.*, 2006). A falta de conhecimento sobre a diversidade dos microrganismos no ambiente aquático é principalmente devido às limitações para o isolamento e cultivo em laboratório, uma vez que apenas uma pequena fração (<1%) é cultivável (AMANN *et al.*, 1995).

Entender o papel dos microrganismos em ambientes estruturalmente saudáveis e ecossistemas marinhos estressados pode fornecer o mecanismo básico para modelos de prognósticos (AZAM e WORDEN, 2004).

No Brasil, estudos têm demonstrado a presença de *Vibrio* spp. no ecossistema aquático, lesões cutâneas em pescadores, lesões superficiais de mamíferos (PEREIRA *et al.*,

2007) e a partir de alimentos de origem marinha (pescados) caracterizando seu envolvimento em casos de doenças de transmissão alimentar (DTA). Profissionais do ramo da pesca, mergulhadores e manipuladores de alimentos representam grupo de risco nas infecções causadas por vibriões (RODRIGUES *et al.*, 1992; RODRIGUES *et al.*, 2001; PEREIRA, 2003).

As espécies de vibrio permanecem entre os agentes infecciosos que representam um grande potencial de ameaça à saúde pública. Para entender a emergência de doenças é importante investigar o agente e sua interação com seu reservatório ambiental, vetores e outros animais hospedeiros.

Várias atividades antropogênicas e alguns processos naturais trazem efeitos adversos em determinadas condições ambientais que afetam respostas fisiológicas como viabilidade, metabolismo, estágio de dormência e morte entre os microrganismos locais. As respostas das bactérias heterotróficas às mudanças ambientais são rápidas e consistentes quando comparadas com as demais formas superiores da biota marinha. Através de uma análise de parâmetros bacteriológicos relevantes algumas respostas são úteis para o monitoramento da qualidade ambiental marinha (RAMAIAH *et al.*, 2002).

O presente trabalho demonstrou que a água e plâncton são diferentes fontes ecológicas das espécies *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus*. Muitos investigadores (ARIAS *et al.*, 1999, VARNAM e EVANS, 2000; STROM e PARANJPYE, 2000; CAVALLO e STABILI, 2002; HARWOOD *et al.*, 2004; TANTILLO *et al.*, 2004) relatam que a temperatura da água estaria relacionada à concentração de vibrios patogênicos, sem dúvida este é um fator relativo, principalmente em ambientes tropicais onde não existem diferenças sazonais significativas que aumentem ou diminuam demais as temperaturas nas águas, que se mantêm relativamente constantes numa faixa de 25-28 °C, de acordo ao observado no presente estudo. Entretanto, nenhum dos parâmetros analisados demonstrou ter correlação positiva ou negativa com a contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* ou a presença de Vc e Vp.

A caracterização molecular das espécies de *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*, ferramenta que ajuda no diagnóstico rápido do agente que é melhor ainda quando está associada à caracterização dos fatores associados à virulência, nos permitiu verificar que todos os isolados encontrados de Vc e Vp não possuem potencial epidêmico, com base nos principais fatores associados à virulência descritos. Entretanto, foi demonstrado em alguns trabalhos que genes associados à patogenicidade de Vp e Vc podem ser encontrados circulando entre espécies diferentes de *Vibrio* (SECHI *et al.*, 2000; BAFFONE *et*

al., 2006), assim como somente uma pequena porcentagem pertenciam às espécies Vp e Vc e em somente nestas foram pesquisados estes genes, seria interessante a continuidade de um estudo pesquisando estes mesmos genes no restante dos vibrios não identificados, pois estes podem também representar um importante reservatório de genes de virulência no ambiente aquático.

São diversas as circunstâncias que podem permitir a emergência de cepas patogênicas de *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus* tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. Modificações eológicas dos ambientes naturais, trocas climáticas, aumento do número de populações suscetíveis (por exemplo, indivíduos imunocomprometidos) são alguns exemplos. A significância para a saúde pública depende do estado de saúde da população suscetível a este ambiente alterado, assim como a concentração e a patogenicidade do microrganismo (RIVERA *et al.*, 2003).

6.2 Regiões Portuárias Brasileiras

A zona costeira abriga um mosaico de ecossistemas de alta relevância ambiental, cuja diversidade é marcada pela transição de ambientes terrestres e marinhos, com interações que lhe conferem um caráter de fragilidade e que requerem, por isso, atenção especial do poder público, conforme demonstra sua inserção na Constituição brasileira como área de patrimônio nacional (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE/ PROGRAMA NACIONAL DO MEIO AMBIENTE II, 2004).

A costa brasileira ocupa zonas subtropicais e tropicais onde predominam águas oligotróficas transportadas pela Corrente do Brasil (regiões Nordeste, Central e Sul) e pela Corrente Norte do Brasil (regiões Nordeste e Norte).

O transporte marítimo de produtos entre países utiliza de forma crescente instalações portuárias, que abrigam tanto portos organizados, quanto terminais privados, que dão suporte e favorecem o desenvolvimento de parques industriais voltados à exportação, e que se instalam em regiões próximas à zona costeira. Isto provoca o surgimento de grandes conglomerados na zona costeira dos vários países, explicando em parte a concentração populacional presente nessas áreas.

A crescente ocupação das regiões costeiras e a formação de grandes centros urbanos costeiros têm resultado, nas últimas três décadas, na elevação dramática da liberação de nutrientes e outros materiais deletérios, incluindo organismos patogênicos. A perspectiva do crescimento continuado em densidade demográfica costeira, conforme temos observado nas

últimas décadas, urge pelo estabelecimento de estratégias adequadas de manejo e de redução dos impactos ao meio ambiente e à saúde humana (GEO BRASIL, 2002).

A principal dificuldade do monitoramento da qualidade da água de um determinado local para fins de recreação de contato primário é o estabelecimento de indicadores adequados e a definição dos critérios a serem adotados para a avaliação da balneabilidade. Nesse sentido, procura-se relacionar a presença de indicadores microbiológicos de poluição fecal no ambiente aquático, e o risco potencial de se contrair doenças infecciosas por meio de sua utilização para recreação. Esses critérios devem estar sempre associados ao bem estar, à segurança e à saúde da população. Analisar todos os microrganismos veiculados pela água associados a doenças é inviável, tanto em termos de tempo quanto pelo alto custo envolvido. Por estas razões, é uma prática comum monitorar uma bactéria, normalmente não patogênica, presente em alta densidade nas fezes humanas e animais, cuja presença em altas concentrações no meio aquático indica a existência de contaminação fecal e a possível presença de patógenos entéricos (CETESB, 2008).

As condições do ambiente marinho dificultam o isolamento de bactérias patogênicas; isso explica porque as pesquisas sobre a contaminação microbiana do litoral limitam-se geralmente à determinação das concentrações de bactérias indicadoras da poluição fecal. No mundo todo, o grupo mais utilizado nessas pesquisas são os *et aliformes* e, mais recentemente, os *estreptococos intestinais*. Como indicador de poluição fecal recente, os *et aliformes* termotolerantes (anteriormente denominados *et aliformes fecais*) apresentam-se em grandes densidades nas fezes, sendo, portanto, facilmente isolados e identificados na água por meio de técnicas simples e rápidas, além de apresentarem sobrevivência semelhante à das bactérias enteropatogênicas (CETESB, 2008).

Um relato recente da Organização Mundial de Saúde estimou que um em cada vinte banhistas de “águas aceitáveis”, ficará doente depois de arriscar-se pelo menos uma vez no mar (U. N., 2008). A WHO (1998) estimou que em cada 100 adultos saudáveis que se banha pelo menos uma única vez em águas marinhas de clima temperado consideradas “aceitáveis”, com uma concentração média de 50 *estreptococos fecais*/100 mL, pelo menos 5 irão apresentar casos clínicos de doenças entéricas. Em outras palavras, cerca de 5% dos banhistas adultos com uma única exposição de banho no mar poderá adoecer com gastroenterite comparados com aqueles que não se expõem (SHUVAL, 2003).

Bactérias patogênicas podem continuar viáveis por semanas e vírus pode sobreviver por meses do ambiente marinho, adsorvidos em partículas orgânicas ou nos tecidos de peixes e frutos do mar. Fundamental para o entendimento das doenças infecciosas é a identificação,

isolamento e caracterização do agente causativo, permitindo o desenvolvimento de métodos de diagnóstico específicos para monitoramento epidemiológico e da resistência do patógeno (HARVELL *et al.*, 1999).

Estratégias de gerenciamento de risco precisam considerar o pouco conhecimento das populações para viver e lidar com os riscos, levando em conta objetos de percepção do risco e ameaças emergentes como o aquecimento global e mudança climática. Dados de riscos relacionados à água são necessários para sustentar os diversos perigos, determinar os indicadores relacionados ao perigo, operar sistemas eficientes de alerta, desenvolver programas de conscientização e permitir que instituições se adaptem a mudanças ambientais e sociais. A disponibilidade e o acesso aos dados são, portanto essenciais para a análise do perigo e avaliação da vulnerabilidade.

Para cada uso pretendido para as águas costeiras requer-se um nível de qualidade e faz-se necessário um monitoramento específico, adequado às necessidades criadas pela atividade desenvolvida. Dessa forma, o monitoramento adotado deve dar subsídios tanto para garantir a qualidade requerida ao uso do recurso hídrico, como também para manter sua qualidade ambiental visando ao bem-estar e à saúde da população que utiliza esse recurso (CETESB, 2008).

A qualidade das amostras foi avaliada conforme a Resolução CONAMA 357 de 17/03/2005, pelos padrões microbiológicos estabelecidos para águas destinadas à navegação. Esta resolução enquadra os corpos d'água em águas doce, salobra e salina e os classifica em função dos usos preponderantes. A água doce destinada à navegação pertence à classe 4 e não possui padrões microbiológicos para sua avaliação. As águas salobra e salina pertencem à classe 3 e devem ter um limite de 4.000 Et al.iformes termotolerantes por 100 mL em 80% ou mais de pelo menos seis amostras et al.etadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. Apesar de não terem sido et al.etadas amostras durante um ano com frequência bimestral, os resultados das amostras foram avaliados como indicativas de contaminação pontual.

Pela análise pontual dos portos de Belém e do Rio Grande que apresentaram salinidade entre 0 e 0,1‰ foi possível classificá-los como portos de água doce. Entretanto o porto do Rio Grande é considerado porto marítimo, provavelmente, na hora da et al.eta este deveria estar sob influência do escoamento da Lagoa dos Patos, pois está localizado na margem direita do canal do norte, que liga a Lagoa dos Patos ao oceano Atlântico. Já o porto de Belém está distante do oceano em 120 km, na baía de Guajará e os resultados condizem

com o esperado. Nos portos de Belém e Rio Grande os resultados da condutividade obtidos indicaram uma elevada degradação do ambiente aquático.

No porto de Belém tanto as contagens de BVM, quanto as de CV em água e plâncton foram elevadas. Apesar de não terem sido encontradas as bactérias *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* pela metodologia proposta neste trabalho, Souza (2007) confirmou a deterioração da qualidade da água pela presença de cepas de *V. cholerae* toxigênicas (*ctxA+*) através de outras metodologias, o que deixa toda região em alerta quanto a possibilidade de surtos de cólera. Os resultados, apesar de indicativos, demonstraram que a qualidade microbiológica da água da região portuária de Belém está imprópria, principalmente em relação à poluição fecal, e que não deveria ser usada como água de lastro ou para qualquer outro fim. Segundo a WHO (2003) qualidade ou segurança da água costeira é mais bem definida pela combinação de inspeção sanitária e avaliação da qualidade microbiológica desta. Assim, através destes resultados foi possível verificar que a população da cidade de Belém está sob risco de ocorrência de doenças de transmissão hídrica, inclusive a cólera, sendo necessário o estabelecimento de um monitoramento rotineiro da qualidade microbiológica de toda a área do porto de Belém, bem como da água de lastro a ser descarregada, além do desenvolvimento de programas de saneamento.

No porto de Rio Grande as baixas frequências e abundâncias dos indicadores de contaminação fecal e também menores abundâncias de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*, podem estar relacionadas o pH ligeiramente acidificado da água (5,5 a 6,0), entretanto isto não foi comprovado estatisticamente, sendo necessário uma maior amostragem para esta conclusão. Neste caso, a contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* no plâncton foram mais elevadas que o porto de Belém demonstrando que estes fazem parte de sua microbiota. Neste porto nenhum isolado permaneceu viável para triagem bioquímica. Diversos trabalhos comprovam a relação do plâncton e bactérias do gênero *Vibrio* spp. Em 1973, Kaneko e Et al.well, demonstraram a importância do zooplâncton no ciclo anual de *V. parahaemolyticus*. Em 1983, Huq *et al.* relataram a associação do *V. cholerae* com copepodes planctônicos. Em 1990, Tamplin e et al.aboradores demonstraram que estes copepodes desempenham um papel importante na sobrevivência e distribuição dos vibrios no ambiente aquático. Em 1996, Et al.well concluiu que a associação do *V. cholerae* com o plâncton é um fator significativo na ocorrência da cólera em áreas costeiras mundiais tropicais e temperadas.

Em Fortaleza as concentrações de bactérias marinhas viáveis, membros presuntivos da família *Vibrionaceae* e et al.iformes termotolerantes foram baixas, não ultrapassando o limite estabelecido para águas destinadas à navegação. Foi triado bioquimicamente somente um

isolado proveniente do plâncton, pertencente ao gênero *Vibrio* spp., sendo este identificado pela PCR como *V. parahaemolyticus* *tdh/trh* negativo. A qualidade microbiológica não está comprometida uma vez que também não foram isoladas cepas de *V. cholerae* toxigênico. Entretanto trabalhos realizados pela Universidade Federal do Ceará nos pontos de Volta da Jurema e Mucuripe (pontos 1 e 2) demonstraram a presença de *Salmonella* spp, *E. et al.i* e *E. et al.i* enteropatogênico (EPEC) sorogrupos O26 e O127 (MELO *et al.*, 1997; VIEIRA *et al.*, 1998, VIEIRA *et al.*, 2001). Estes resultados permitiram concluir que a presença de contaminação de indicadores de contaminação fecal e microrganismos patogênicos nestes pontos é intermitente e necessita de uma maior amostragem para uma classificação definitiva.

No porto de Paranaguá foram realizadas três etapas, sendo a água considerada salobra. BVM foram frequentes em 100% das amostras e em altas abundâncias, principalmente nas duas primeiras etapas (fevereiro e março). Apesar de uma das amostras ter apresentado contagem de $9,2 \times 10^3$ UFC/100 ml em etapas termotolerantes, todas estavam de acordo com os padrões estabelecidos pela resolução CONAMA 357/05, não havendo um nível de contaminação fecal que compromettesse as atividades de navegação. Entretanto, Souza (2007) isolou cepas de *V. cholerae* toxigênicas (*ctxA*+) em quatro dos seis pontos no mês de fevereiro, demonstrando que a água do entorno do porto de Paranaguá apresenta risco ao uso como lastro ou para qualquer outro fim. É importante ressaltar que houve o isolamento de cepas de *V. cholerae* em amostra de água de 5 litros sem isolamento em amostra de 1 litro e também que foi possível detectar a espécie através da PCR, possivelmente no estágio VNC, em amostras onde não houve isolamento. Assim a autora conclui que sempre que possível, um volume maior de amostra deve ser analisado e, de preferência, utilizando-se métodos mais sensíveis. Nesta pesquisa, através de metodologias tradicionais foi possível triar bioquimicamente 8 isolados como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., destes, foram identificadas 5 cepas de *V. parahaemolyticus* *tdh/trh* negativas, sendo 1 proveniente de amostra de água e 4 de amostras de plâncton e nenhuma de *V. cholerae* ou *V. vulnificus*, o que condiz com os resultados apresentados por Souza (2007).

Blackwell e Oliver (2008) estudaram a influência de 17 parâmetros físico-químicos e bacteriológicos na distribuição e ocorrência de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* na região costeira da Carolina do Norte e verificaram através do coeficiente de correlação de Spearman que estas três espécies estavam altamente correlacionadas com a temperatura da água e níveis de vibrio totais (determinado pela contagem no TCBS), e sugeriram que somente a temperatura da água pode ser um parâmetro excelente para prever os níveis destes três vibrios, representando um método simples para caracterização do perigo

potencial que estes microrganismos possam representar em águas estuarinas, assim como sugerido pelo estudo de análise de risco da FAO/WHO (2002). A distribuição das populações de vibrio tem sido relacionada a fatores ambientais incluindo salinidade (KASPAR E TAMPLIN, 1993; MOTES *et al.*, 1998), temperatura (KANEKO e ET AL.WELL, 1973; JIANG E FU, 2001) e, em alguns casos a abundância de organismos hospedeiros (LEE E RUBY, 1994). Entretanto neste trabalho, nenhum dos portos apresentou correlação da CV com nenhum dos parâmetros físico-químicos ou microbiológicos pesquisados. No caso de isolados identificados como *Vibrio* spp. o único parâmetro onde foi possível a observação de uma correlação positiva foi o do indicador fecal Enterococos intestinais ($p=0,005$ e $r=0,554$) e somente no porto de Paranaguá. Cepas identificadas pela PCR como Vp também apresentaram correlação positiva com a CVP ($p=0,004$ e $r=0,576$), também somente no porto de Paranaguá.

No porto de Recife foram realizadas quatro et al.etas e suas águas puderam ser classificadas como salobra/salina. Foi observada uma baixa condutividade, condizendo com a baixa concentração dos indicadores de contaminação fecal. Membros presuntivos da família *Vibrionaceae* foram freqüentes em todas as amostras de água e em 23 das 24 amostras de plâncton, entretanto com maiores contagens observadas no plâncton. Dos 29 isolados viáveis provenientes da água e do plâncton, 21 foram triados bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., destes 15 foram identificados pela PCR como *V. parahaemolyticus* *tdh/trh* negativos, sendo 10 provenientes de amostras de água e 5 de amostras de plâncton. Não foram identificados cepas da espécie *V. cholerae* e *V. vulnificus*. No entanto, Souza (2007) isolou destas mesmas amostras, *V. cholerae* O1 ou não-O1 toxigênico (*ctxA*+) em três meses, condenando o uso dessa água como lastro de navios. O isolamento de *V. cholerae* em amostras de 1 litro de água foi confirmado pela autora através da análise de amostras de 5 litros, onde também foram detectados *V. cholerae* pela técnica de PCR em amostras onde antes não haviam sido isolados. Estes resultados confirmam resultados de uma pesquisa realizada entre 1992 e 1994 em Pernambuco, com amostras de águas de diferentes ecossistemas e de alimentos, na qual foi verificada a presença de cepas de *V. cholerae* O1 (ET AL.AÇO *et al.*, 1998).

A água do porto de Santos foi classificada como salobra, apesar da salinidade nos pontos 1, 2 e 3 nos meses de fevereiro, março e abril serem superiores a 30‰. Esse aumento na salinidade pode ser em função da distância dos pontos em relação à costa e também em função da maré.

BVM foram freqüentes em 100% das amostras e em altas abundâncias, assim como a contagem de membros da família *Vibrionaceae* na água e no plâncton, com freqüências de 96 e 100% respectivamente, sendo que as maiores abundâncias foram observadas no plâncton, com até 3 escalas logarítmicas de diferença das amostras de água. O número de bactérias dentro dos copepodes é geralmente constante, enquanto que as contagens externas variam com a temperatura da água. A contagem de et al.ônias de espécies de *Vibrio* algumas vezes chega até 10^9 células/grama por peso úmido de plâncton. Isto é significativamente alto quando comparado com o número detectado na et al.una d'água circundante (10^2 células/mL) (URAKAWA E RIVERA, 2006).

Dos 14 isolados viáveis obtidos das amostras de água e plâncton, 9 foram triados bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., sendo 3 provenientes da água e 6 do plâncton. Destes foram identificadas pela PCR 6 cepas *V. parahaemolyticus* *tdh/trh* negativas, sendo 5 provenientes do plâncton e 1 da água. Não foram identificadas cepas das espécies *V. cholerae* e *V. vulnificus*, em contradição com o trabalho realizado por Souza (2007) que constatou a presença de cepas de *V. cholerae* toxigênicas (*ctxA*+) nestas mesmas amostras, nos meses de fevereiro e abril, confirmando o ocorrido em amostras de 5 litros de água analisadas, sugerindo que a concentração deste microrganismo é alta na área portuária de Santos, comprometendo sua qualidade. Et al.iformes termotolerantes foram freqüentes em 96% das amostras e enterococos intestinais em 21%, entretanto todas estavam dentro dos padrões estabelecidos pela resolução CONAMA 357/05.

V. cholerae foi isolado de amostras de água do mar, água doce e água de esgoto no Estado de São Paulo em períodos não epidêmicos, tanto pertencente aos sorogrupos não-O1, como também do sorogrupo O1 não toxigênico (MARTINS *et al.*, 1988). Posteriormente, durante o período epidêmico de cólera, foi detectada a presença de *V. cholerae* O1 na forma viável, mas não cultivável (MARTINS *et al.*, 1993) e *V. cholerae* O1 toxigênico cultivável (CETESB, 1997). Amostras do ambiente aquático e do zooplâncton et al.etados na região de São Sebastião em 1997, também foram positivas para *V. cholerae* O1 na forma viável mas não cultivável (RIVERA e RUBIN, 1997).

As águas do porto de Itaguaí foram classificadas como salinas de acordo com a média aritmética obtida dos resultados analisados. BVM foram freqüentes em 100% das amostras, entretanto suas abundâncias médias foram baixas, assim como ocorrido nas contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* em água e plâncton, com freqüências de 83% ambas. Não foi constatada a presença de nenhum dos indicadores fecais estudados, tampouco de cepas do gênero *Vibrio* spp. Nestas mesmas amostras, Souza (2007) constatou a presença

de somente cepas de *V. cholerae* não-O1 não toxigênicas, em concordância com outro estudo realizado por Rodrigues e Hofer (1986) na Baía de Itaguaí, entre 1981 e 1982, onde foram detectadas somente cepas de *V. cholerae* não-O1 em amostras de ostras e de água do mar.

Neste trabalho foi possível concluir que os microrganismos pertencentes à família *Vibrionaceae* e ao gênero *Vibrio* spp. são bactérias autóctones do ambiente marinho, principalmente em regiões tropicais e temperadas (ET AL.WELL, *et al.*, 1977; MARTINS, 1988; ET AL.WELL, 1996; TANTILLO *et al.*, 2004; URAKAWA E RIVERA, 2006). Cada local estudado possui determinadas características próprias, apesar disto as cepas de Vp e Vc encontradas não ofereciam nenhum risco à saúde humana em nenhum dos locais, entretanto essa amostragem foi apenas indicativa. A biomassa e a diversidade de microrganismos dependem do grau de “pureza” ou estado de conservação do ambiente aquático. As atividades humanas nas regiões costeiras podem influenciar o estado preservado dos ambientes. Melhorar o monitoramento da qualidade da água e facilitar programas de manutenção e políticas de melhorias para educar o público e diminuir a contaminação e desperdício dos corpos de água também pode reduzir o risco de doenças de veiculação hídrica. Devido à falta de barreiras protetoras nas praias, os oficiais de saúde pública e os responsáveis pela manutenção destas devem implementar programas para o teste da qualidade de água e educar os frequentadores a respeito de medidas de prevenção apropriadas, principalmente medidas em relação a patógenos ambientais que não podem ser prevenidos através dos atuais padrões de qualidade da água (por exemplo, doenças causadas por *Vibrio* spp.) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006).

A maioria dos portos brasileiros não possui estrutura adequada para a gestão ambiental, nem no que se refere ao controle de resíduos e outros impactos ambientais no dia-a-dia da atividade, nem no que se refere aos planos de contingência para acidentes e no tocante aos projetos de expansão e modernização portuária (GEOBRASIL, 2002).

6.3 Tanques de Lastro de navios

O oceano é o único meio de subsistência para muitas comunidades principalmente nas populações costeiras em expansão (UNITED NATIONS, 2008). Um dos impactos antrópicos mais significantes para alteração deste ecossistema é o despejo de água de lastro dos navios, devido à grande introdução de espécies não-nativas (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, 2006). A introdução de espécies marinhas invasoras em novos ambientes pela água de lastro transportada nos navios e outros vetores têm sido identificada como um

dos quatro maiores perigos aos habitats oceânicos. Os outros três são a poluição marinha derivada de fontes terrestres, exploração excessiva dos recursos marinhos e alteração/destruição física do habitat marinho (INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION, 2008).

A variação dos valores dos parâmetros como a salinidade, temperatura, pH e condutividade, observada nos resultados obtidos, demonstrou que a água de lastro apresenta um ambiente propício para o crescimento de microrganismos. As amostras et al. etadas em Rio Grande (RS) foram as que apresentaram diferenças estatisticamente significantes em condutividade em relação às demais amostras et al. etadas nos outros portos. E as amostras et al. etadas em Recife (PE) apresentaram diferenças significantes em pH entre as amostras et al. etadas no Rio de Janeiro, Belém (PA), Santos (SP), Vitória (ES) e Paranaguá (PR).

A condutividade é uma expressão numérica da capacidade de uma água conduzir a corrente elétrica. Depende das concentrações iônicas e da temperatura e indica a quantidade de sais existentes na et al. una d'água, e, portanto, representa uma medida indireta da concentração de poluentes. Em geral, níveis superiores a 100 μS indicam ambientes impactados. A condutividade também fornece uma boa indicação das modificações na composição de uma água, especialmente na sua concentração mineral, mas não fornece nenhuma indicação das quantidades relativas dos vários componentes. A condutividade de uma água do mar de salinidade 35 é de cerca de 53-60 mS , dependendo da temperatura.

No caso da contagem de membros da família *Vibrionaceae* (CV), a maior frequência foi observada em amostras et al. etadas no Rio de Janeiro, com crescimento em 57,1% das amostras analisadas, entretanto estas também apresentaram a menor abundância média com $3,0 \times 10^0$ UFC/ml. A maior abundância média foi observada em Fortaleza com $3,0 \times 10^2$ UFC/ml e estava correlacionada altamente e positivamente à contagem de BVM e à contagem de membros da família *Vibrionaceae* no plâncton (CVP) Belém (PA) e Santos (SP) também apresentaram correlação altamente positiva entre CV e CVP. Membros da família *Vibrionaceae* foram detectados em 32 das 105 amostras de água (30,5%) et al. etadas no lastro de navios, no caso das amostras de plâncton, foram detectados em 20 das 105 amostras analisadas (19%), porém apresentaram abundâncias médias maiores em até 1 escala logarítmica e diferença estatisticamente significativa entre os locais de amostragem ($p=0,002$), segundo o teste de Kruskal-Wallis. As amostras et al. etadas em Belém apresentaram correlação altamente negativa entre pH e CV na água.

Ruiz *et al.* (2000) fizeram a quantificação de microrganismos em água de lastro de embarcações que chegavam em Chesapeake Bay de portos estrangeiros e relataram

abundâncias médias de $8,3 \times 10^8$ de bactérias e $7,4 \times 10^9$ partículas virais l^{-1} . Devido suas altas densidades os microrganismos são transferidos e introduzidos globalmente via água de lastro em maiores números que outras classes de organismos.

Os tanques de água de lastro podem ser caracterizados como ambientes de “zonas escuras entre marés (dark intertidal zones)” com grandes condições variáveis hidrológicas, que por sua vez abrigam organismos de diversos táxons (DRAKE *et al.*, 2005).

Os indicadores tradicionais de contaminação fecal, analisados neste estudo, como *et al.*ifagos (presentes em 22,8% das amostras), enterococos intestinais (19%), *Et al.*iformes termotolerantes (10,5%) e *Clostridium perfringens* (12,4%) não foram uma boa alternativa como indicadores da qualidade microbiológica da água de lastro devido sua baixa frequência nas amostras. Foi observada também uma maior frequência de enterococos intestinais do que *et al.*iformes fecais, sendo explicado principalmente pelo valor de salinidade que parece acelerar a inativação dos *et al.*iformes nos ambientes marinhos, sendo menos resistentes que os enterococos intestinais na água do mar (WHO, 2003a).

De acordo com os padrões de balneabilidade do CONAMA (até 1.000 CT/100 ml) ou da OMS (500 enterococos/100 ml), todas as amostras analisadas neste trabalho encontram-se dentro dos padrões exigidos. Entretanto, de acordo aos padrões propostos pela 47a MEPC, que rebaixa os critérios para 35 EF/100 ml e 126 EC/100 ml, 7% das amostras seriam consideradas inaceitáveis. O estado americano do Havaí adotou *Clostridium perfringens* como indicador de balneabilidade (<5 CFU/100 mL), pois as autoridades locais consideram que este é o melhor indicador microbiológico em águas tropicais.

A partir da implementação da resolução A.868(20) da IMO, em 1997, muitos navios comerciais passaram a realizar a troca da água de lastro em região oceânica. Este método veio a ser o mais amplamente utilizado nos últimos anos na tentativa de minimizar os impactos do lançamento da água de lastro em regiões costeiras e portuárias.

A troca oceânica está embasada em dois pressupostos centrais: 1) a água oceânica é menos rica em plâncton do que as águas costeiras, estuarinas ou interiores; portanto, o número total de organismos captados e posteriormente liberados durante o deslastre é menor quando a água oceânica é utilizada como lastro; e 2) a probabilidade de sobrevivência e crescimento de espécies oceânicas em águas costeiras (e vice-versa) é muito baixa ou nula; portanto, o uso de água oceânica como lastro promoveria a eliminação das espécies costeiras que porventura permaneçam nos tanques após uma troca não totalmente eficiente, enquanto que as espécies oceânicas liberadas no ambiente costeiro após o deslastre não teriam chances significativas de sobrevivência.

A ANVISA, através da Resolução da Diretoria Regulatória, RDC 217/01, artigo 26 torna obrigatória a entrega, quando da entrada da embarcação no Porto de Controle Sanitário, das informações relativas à água de lastro, por meio do preenchimento completo do Formulário de Informações sobre a Água de Lastro, assinado pelo comandante ou por alguém por ele designado. Este formulário foi instituído conforme o modelo da Resolução A868(20) da IMO.

No Brasil, qualquer embarcação, a critério da autoridade sanitária, está sujeita à coleta de amostra de água de lastro para análise (Art. 28 RDC 217/01), porém este procedimento não pode ser realizado em todas as embarcações que operam em nossos portos, haja visto o grande movimento de embarcações, o custo das análises e o tempo necessário para obter-se o laudo laboratorial. A alternativa recomendável é monitorar os deslastramentos a partir de uma análise de risco para cada embarcação.

Os microrganismos mais intensamente estudados na água de lastro têm sido os dinoflagelados tóxicos e a bactéria *V. cholerae* e as razões pelas quais a transferência de microrganismos aquáticos são intensamente investigados são: suas altas densidades, habilidade de entrarem em estágios de “dormência” e seu potencial tóxico e de patogenicidade (DRAKE *et al.*, 2005; DRAKE *et al.*, 2007).

Dos 99 isolados viáveis obtidos das amostras de água e plâncton de lastro, 41 foram triados bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp., compreendendo cerca de 41,4% da abundância total, sendo 34 provenientes da água e 7 do plâncton. Destes, somente 5 foram identificados como *V. parahaemolyticus* *tdh/trh* negativos e 3 como *V. cholerae* pela PCR, sendo estes 3 provenientes de uma mesma amostra de Belém e em nenhum foi detectada a presença dos genes *ctxA* e *tcpA*. Souza (2007) também pesquisou a presença de *V. cholerae* nestas mesmas amostras de plâncton e água de lastro, entretanto através de outras metodologias com e sem pré-enriquecimento em caldo APA e detectou a presença desta bactéria em 31 das 105 amostras analisadas, com o isolamento total de 23 cepas identificadas como *V. cholerae* Não-O1 e O1, também com a presença dos genes *ctxA* e *tcpA* em ambos os sorotipos. O genótipo mais frequente foi *ctxA*+/ *tcpA*- (50,0%), três amostras continham *V. cholerae* *ctxA*+/ *tcpA*+, quatro com genótipo *ctxA*+/ *tcpA*- e uma amostra apresentou cepas com os três genótipos. *V. cholerae* foi detectada em 44,9% das 69 amostras de água de lastro enriquecidas com caldo APA que foram testadas pela PCR, mas foi isolada em apenas 14 destas amostras, quando pesquisado pela metodologia tradicional. Estes resultados sugeriram a presença da espécie no estágio VNC em 24,6% (17) das amostras testadas pela PCR.

No estudo feito por Burkholder *et al.* (2007), foi detectado *Vibrio* spp. em 16 (26%) dos 62 tanques amostrados, e suas densidades variaram de ~ 200 (UFC/100 ml⁻¹) até incontável ou muito numeroso para contagem, com uma estimativa mínima de contagem de $\sim 3,0 \times 10^4$ (UFC/100 ml⁻¹). *Vibrio* spp. compreenderam cerca de 0 a 10% da abundância bacteriana total no tanques de lastro onde ocorreram, mas cepas de *V. cholerae* toxigênicos não foram detectados em nenhum dos tanques. Neste estudo não houve correlações estatisticamente significantes entre as densidades de *Vibrio* spp. e as variáveis físico-químicas, exceto em Santos (SP), onde a temperatura correlacionou negativamente com *Vibrio* spp ($p=0,042$ e $r=-0,427$).

Nos resultados obtidos por Mimura *et al.* (2005), que analisaram a mudança populacional bacteriana em tanques de lastro em uma viagem do Japão até o Qatar também não foi detectado *V. cholerae* toxigênico em nenhuma das amostras de água de lastro analisadas pela metodologia convencional.

O baixo número de isolados obtidos neste trabalho foi possivelmente devido à metodologia convencional e o meio de cultura escolhido que podem ter subestimado o número real. Além disso, sabe-se que em relação a amostras ambientais, o uso de métodos convencionais utilizando meios de cultura proporciona uma menor frequência de isolamento ou concentração bacteriana, pois os meios não suprem todas as necessidades fisiológicas bacterianas (HUQ *et al.*, 2000). Entretanto, a frequência dos isolados ambientais de *V. cholerae* que possuem os fatores associados à virulência é baixa (FARUQUE *et al.*, 1998; RIVERA *et al.*, 2001).

Joachimsthal *et al.* (2003) compararam a eficiência de métodos tradicionais de contagem como spread plate em relação a métodos como enumeração com DAPI e citometria de fluxo e verificaram que o método por DAPI é o mais eficiente e mais rápido, seguido de citometria de fluxo, entretanto o DAPI irá corar todos os DNA ricos em adenina-timina resultando em contagens que incluem todos os tipos de organismos, incluindo algas e protozoários, para tanto é necessário o treinamento adequado de quem irá interpretar estes dados.

A grande proporção de organismos anaeróbios facultativos é uma grande causa de preocupação na consideração do gerenciamento do despejo da água de lastro, uma vez que a maioria dos agentes veiculadores de doenças hídricas são anaeróbios facultativos (U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001). Isto significa que tanques de lastro contendo grandes proporções destes microrganismos representam um grande risco no despejo de espécies potencialmente perigosas em águas portuárias (JOACHIMSTHAL *et al.*, 2003).

A enumeração apurada de células bacterianas é uma ferramenta importante no monitoramento da ecologia microbiana ou da qualidade bacteriológica da água do mar e do lastro de navios (JOACHIMSTHAL *et al.*, 2003).

Os navios são responsáveis por 80% do comércio mundial e pelo despejo de 12 bilhões de toneladas de água de lastro por ano. Nos últimos 30 anos o comércio marítimo mundial movimentou cerca de 2490 milhões de toneladas em 1970 e um pouco mais que dobrou para 5330 milhões de toneladas em 2000 (BAX *et al.*, 2003).

O aumento populacional, de comércio e turismo nas regiões costeiras têm resultado num aumento do número de novos habitats, como por exemplo, piers, marinas, áreas eutrofizadas e poluídas, docas, etc. Quando estas áreas são desenvolvidas em regiões sujeitas a um alto fluxo de organismos alóctones como portos internacionais, aumenta a oportunidade de estabelecimento para estas espécies invasoras. Não é propriamente a presença física destas novas estruturas, mas também as mudanças físicas e biológicas ambientais ao redor destas que vão alterar o habitat que as comunidades locais não estão adaptadas (BAX *et al.*, 2003).

Antes que as espécies invasoras possam ser gerenciadas é necessário determinar os riscos da introdução, estabelecimento e disseminação destas em determinadas regiões, e seus impactos no ecossistema, saúde humana e atividades econômicas (BAX *et al.*, 2003).

Em 1999 foi relatado um surto de cólera no litoral do Paraná, com núcleo em um bairro da cidade de Paranaguá localizado próximo ao porto. No total, 467 casos foram confirmados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002). Não se pode afirmar com absoluta certeza qual foi a causa deste surto, entretanto existe a possibilidade de que a veiculação de cepas patogênicas pela água de lastro tenha sido o mecanismo responsável pela introdução e rápida dispersão da doença naquela região.

Nesta pesquisa foram quantificadas somente as formas viáveis cultiváveis, isto é, aqueles microrganismos que conseguem crescer em meios de cultura. No entanto, existem microrganismos que não conseguem crescer em meios de cultura convencionais e são denominados microrganismos viáveis porém não cultiváveis que representam a maior parte da espécies marinhas bacterianas (EILERS *et al.*, 2000).

Analisando-se as áreas em maior risco com o deslastro dessas águas, os portos de Recife (PE) e Paranaguá (PR) receberam uma percentagem relativamente alta de amostras positivas para Enterococos intestinais, ocorrendo o mesmo nos portos do Estado de Espírito Santo (Ponta Ubu, Praia Mole, Tubarão e Vitória) e de Belém (PA) para os enterofagos F-específicos. Os portos de Rio Grande e Paranaguá receberam as amostras com as maiores concentrações dos indicadores de contaminação fecal.

O gerenciamento das espécies marinhas invasoras é mais bem tratado como um problema epidemiológico. A amostragem é crítica para desenvolver um entendimento dos possíveis riscos na água de lastro e a eficiência das medidas de gerenciamento (DAVID e PERKOVIC, 2004). Existem três implicações diretas. Primeiro, o problema somente piora quanto mais tempo é ignorado, prevenção é mais efetiva e menos custosa do que o controle. Segundo, para o gerenciamento ser efetivo é essencial que todos os vetores importantes sejam identificados e tratados ou no mínimo prevenir sua disseminação para novas áreas. Finalmente, geralmente é impossível prevenir absolutamente a invasão de uma espécie, o que pode ser feito é a redução do risco da invasão e o gerenciamento das invasões que podem vir a ocorrer. Devido a estes fatores é necessário que o desenvolvimento de políticas leve em conta seis pontos no processo genérico de invasão onde a intervenção seja possível: prevenção, detecção, quarentena, erradicação, controle e solução (BAX *et al.*, 2003).

6.4 Moluscos Bivalves

Nas amostras de ostras as contagens de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* foram maiores quando comparadas com as obtidas em amostras de água e plâncton. Atualmente nossa legislação assegura a qualidade do produto avaliando água de entorno onde o bivalve é cultivado utilizando indicadores de contaminação fecal, entretanto o tempo de acumulação e a ação competitiva dos microrganismos autóctones dos bivalves demonstram que estes indicadores são inúteis na avaliação de sua qualidade (LIPP *et al.*, 2002, PRUZZO *et al.*, 2005, MAUGERI *et al.*, 2006, RISTORI *et al.* 2007). As ostras podem concentrar mais de quatro vezes a biomassa de *et al.*iformes fecais e acima de 100 vezes a biomassa de *Vibrios* presentes na água de entorno (BUTT *et al.*, 2004). Do mesmo modo como ocorrido nas amostras de plâncton, a maioria das cepas selecionadas foi confirmada como *vibrios* pelas provas bioquímicas demonstrando também que estes formam parte da microbiota normal de bivalves. Nossos resultados de contagens podem ser comparados com trabalhos realizados na mesma região pelo método de número mais provável. Ristori *et al.* (2007) encontraram concentrações de 6,2 até 44 em ostras cruas e de 12 a $>2,4 \times 10^3$ / g de amostra. A identificação de espécies potencialmente patogênicas entre os *vibrios* isolados de amostras de bivalves representa um perigo para a saúde de indivíduos que consomem ostras cruas (CAVALLO e STABILI, 2002).

Os bivalves podem transmitir vários microrganismos, incluindo vírus, bactérias e parasitas. As espécies de bactérias mais envolvidas com surtos incluem espécies de

Salmonella, *Shigella*, *Listeria*, *Plesiomonas shigelloides*, e o exemplo mais notável são as espécies de *Vibrio*, que estão envolvidas em cerca de 20% de todos os surtos de doenças relacionadas ao consumo de frutos do mar. O processamento adequado dos mexilhões é, sem dúvida, essencial para minimizar os riscos até aqui apontados (PEREIRA, 2003; POTASMAN *et al.*, 2002).

Em 1988, o então Ministério da Agricultura (MA), estabeleceu limites referentes à presença de et al.iformes fecais em águas destinadas ao cultivo de mexilhões (Informação DIPES, no 097/88), estipulando que as áreas proibidas serão aquelas cujos resultados das análises microbiológicas apresentarem níveis superiores a 700 et al.iformes fecais/100 ml de água salgada. Esse mesmo dispositivo estabeleceu que as áreas limitadas para cultivo contenham níveis de et al.iformes fecais entre 70-700 et al.iformes fecais/100ml, sendo indispensável o tratamento dos moluscos através de depuração. As áreas livres para maricultura são aquelas que contêm menos de 70 et al.iformes fecais/100 ml de água salgada (PEREIRA, 2003).

Nos portos de Rio Grande (RS), Fortaleza (CE) e Itaguaí (RJ) não foram identificados cepas do gênero *Vibrio* spp. Em Paranaguá foram triadas bioquimicamente 6 cepas de gênero *Vibrio* spp., destas, 2 foram identificadas pela PCR como Vp *tdh/trh* negativas e 1 como Vc *ctxA/tcpA* negativa. Em Recife (PE) foram triadas 2 cepas do gênero *Vibrio* spp., entretanto nenhuma foi identificada pela PCR como Vc, Vp ou Vv. No porto de Santos foram triadas 5 cepas do gênero *Vibrio* spp., destas 4 foram identificadas pela PCR como Vp *tdh/trh* negativas. Nestas mesmas amostras de bivalves, Souza (2007) encontrou cepas Vc O1 *ctxA* positivas, comprovando o comprometimento da qualidade microbiológica do local. Na área costeira de São Paulo, em Santos, foram triadas bioquimicamente 2 cepas *Vibrio* spp., sendo identificada pela PCR 1 cepa como Vp *tdh/trh* negativa. Em São Sebastião foram triadas 16 cepas como *Vibrio* spp., sendo 13 identificadas como Vp *tdh/trh* negativas e em Ubatuba foram triadas 6 cepas como *Vibrio* spp., sendo 1 cepa identificada como Vp *tdh/trh* negativa e 1 cepa Vc *ctxA/tcpA* negativa. Em Santos e São Sebastião não foram identificadas cepas das espécies Vc e Vv.

Os dados obtidos contrastam com os de Sousa e et al.aboradores (2004) que estudaram a presença de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* em ostras de um estuário na região Nordeste do Brasil, durante um período de 8 meses. *V. cholerae* foi o vibrio mais frequentemente detectado (33,3% das amostras), sendo 20 isolados identificados como *V. cholerae* não-O1/não-O139 e somente um isolado foi identificado como *V. parahaemolyticus* em apenas umas das et al.etas, sendo este Kanagawa negativo. E também com os dados obtidos por

Barros e colaboradores (2003), que detectaram a presença de Vp e Vv em ostras comercializadas na região da Praia do Futuro, Fortaleza (CE). Também foram relatados o isolamento de vibrio não entéricos, inclusive Vv, em bivalves (principalmente em ostras) e outros frutos do mar comercializados em São Paulo e em Ubatuba, como descrito por Matté e *et al.* (1994) e Landgraf e *et al.* (1996). Outros casos também foram descritos por Rodrigues e Hofer (1986), na baía de Sepetiba; e por Barboni (2003), na Baía de Todos os Santos, em Valença (BA).

Dentro desta discussão existem dois importantes fatores que estão intimamente conectados à emergência de infecções por *Vibrio*. O primeiro é garantir a qualidade dos bivalves e dos frutos de mar para proteger a saúde humana e o segundo é a identificação dos perigos microbiológicos nos ambientes marinhos para identificar as prováveis fontes de espécies patogênicas que podem afetar a saúde humana, animal e do próprio recurso (ecossistema marinho).

6.5 Caracterização molecular

As técnicas de tipagem moleculares baseadas em PCR são rápidas e de fácil padronização. PCR de elementos repetitivos (REP-PCR) utilizam primers complementares às seqüências de DNA repetitivas, altamente conservadas, que ocorrem naturalmente para gerar perfis de DNA que permitem a discriminação entre as cepas. Estas seqüências não codificadoras estão presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias Gram-negativas e de diversas Gram-positivas (VERSALOVIC *et al.*, 1991; RASSCHAERT *et al.*, 2005). Estes elementos repetitivos incluem os elementos palindrômicos extragênicos repetitivos (REP) (STERN *et al.*, 1984), as seqüências consensos intergênicas repetitivas (ERIC – Enterobacterial repetitive intergenic consensus) (HULTON *et al.*, 1991), e as seqüências BOX (MARTIN *et al.*, 1992). Estes primers são utilizados para diferenciação entre cepas bacterianas intimamente relacionadas em diversos estudos (JEREK *et al.*, 1999; DOMBEK *et al.*, 2000; RADEMAKER *et al.*, 2000).

ERIC-PCR têm sido aplicado na tipagem de diversas espécies, incluindo *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* (RIVERA *et al.*, 1995b; MARSHALL *et al.*, 1999). As técnicas de tipagem molecular são utilizadas especificamente para propósitos epidemiológicos, pois estas fornecem informações sobre o relacionamento genético entre as cepas, a fonte de infecção e detecção de cepas particularmente virulentas, assim como o estudo da distribuição geográfica

e da distribuição do hospedeiro das possíveis variantes de um patógeno específico (OLIVE e BEAN, 1999).

Neste trabalho foram utilizadas metodologias de PCR de três seqüências repetitivas diferentes (BOX, ERIC e REP). Destas três técnicas analisadas a que obteve maior número de amplificações positivas foi a de BOX-PCR, seguido de ERIC e REP-PCR. Entretanto pelos resultados observados nos dendogramas a que teve maior poder de discriminação foi a técnica do ERIC-PCR, com amplificação de maior número de bandas (2 a 14 bandas) que variaram de 100 a 10000 bp.

As técnicas de ERIC e REP-PCR não permitem o estabelecimento de agrupamentos genéticos bem definidos por serem altamente discriminatórias (MALUPING *et al.*, 2005), sendo estas úteis para acompanhar a disseminação de cepas bacterianas responsáveis por determinados surtos.

No trabalho feito por Bhowmick e colaboradores (2007), que fizeram a tipagem de 71 cepas de Vp isoladas de frutos do mar por diversas técnicas como RAPD, ERIC-PCR e perfil protéico, foi observado na técnica de ERIC-PCR a presença comum a todas as cepas de uma banda de 1500 bp, indicando uma região altamente conservada entre estas.

Maluping e colaboradores (2005) encontraram uma banda comum de 500 e 400 bp no ERIC e REP respectivamente na análise de cepas Vp isoladas nas Filipinas, e sugeriram que estas poderiam ser utilizadas para fins diagnósticos. Entretanto, os nossos resultados demonstraram a inexistência destas em algumas cepas de Vp analisadas. Os autores também fizeram testes de reprodutibilidade e concluíram que o ERIC-PCR foi melhor que o REP-PCR, contrastando com os resultados de Wong e Lin (2001) que preferiram o REP-PCR. Esta conclusão está de acordo com os resultados deste trabalho, que também observou que a técnica de ERIC-PCR permite maior discriminação entre as cepas.

Khan e colaboradores (2002) também analisaram pela técnica de ERIC-PCR cepas de Vp O3:K6 isoladas de surtos no Estados Unidos e obtiveram perfis de bandas que variaram de 100 bp a 5 kb, sendo comum a todas as cepas as bandas de 850 e 1500 bp.

As seqüências ERIC permitiram verificar que a maioria das cepas de *V. cholerae* O1 toxigênicas pertence ao mesmo clone, diferenciando-as das cepas de *V. cholerae* O1 não toxigênicas e não-O1 (RIVERA *et al.*, 1995). Além disso, também verificou-se que a população ambiental de *V. cholerae* O1 é intimamente relacionada à de *V. cholerae* O1 de origem clínica (ZO *et al.*, 2002).

Das 11 cepas identificadas neste trabalho como Vc, 4 apresentaram a banda de 500 bp característica da espécie no ERIC-PCR, as demais apresentaram outros diversos tipos de perfis.

A sequência altamente conservada de 124-127 bp do ERIC foi primeiramente relatada nas enterobactérias *Escherichia et al.* e *Salmonella typhimurium*, e mais tarde em diversas outras bactérias, incluindo Vc (HULTON *et al.*, 1991; VERSALOVIC *et al.*, 1991). Apesar das sequências ERIC serem altamente conservadas ao nível da sequência do nucleotídeo, sua localização cromossomal difere entre as espécies. Zo *et al.* (2002) simulou locais de ligação dos iniciadores do ERIC ao longo da sequência completa dos dois cromossomos de *V. cholerae* O1 El Tor N16961 e encontrou que estes locais estavam uniformemente dispersados através de toda região dos dois cromossomos. Estas características fazem da sequência ERIC um alvo apropriado para tipagem molecular, pois permite amostragem do genoma completo sem influência de qualquer região específica.

Nossos resultados demonstram através destas técnicas que foi possível observar um padrão de origem destas cepas, sendo que as da região costeira de São Paulo tiveram uma maior tendência para formar agrupamentos entre si. Amostras das regiões portuárias de Recife e Santos também tiveram grande tendência de agrupamento apesar da distância geográfica, demonstrando que pode estar havendo um intercâmbio entre estas via água de lastro, visto que estes dois portos são de grande importância na movimentação de cargas ou que cepas de regiões com alto impacto antropogênico podem ter perfis semelhantes.

Apesar destas observações estas cepas, tanto de Vp quanto de Vc apresentaram uma elevada diversidade clonal, principalmente nas técnicas de ERIC e BOX-PCR, demonstrando o alto poder discriminatório destas.

Thompson *et al.* (2003) também avaliaram 106 cepas clínicas e ambientais de *V. cholerae* isoladas no Brasil de 1991 a 2001, porém, pela técnica de AFLP, e verificaram sete grupos principais que se agruparam independentemente do local e o período de isolamento. Assim como nos nossos resultados, a técnica de AFLP também distinguiu cepas O1 e não-O1 e também verificaram alta diversidade entre os isolados não-O1.

Gonçalves *et al.* (2004) também descreveram alta diversidade em cepas ambientais de *V. cholerae* não-O1 isoladas na Baía de São Marcos, no Estado do Maranhão, através de RAPD-PCR.

Muitos métodos que identificam e demonstram os relacionamentos genéticos entre as bactérias estão disponíveis. Entretanto, cada um apresenta determinada limitação. Por exemplo, o MLST (Multi Locus Sequence Typing) é excelente quanto à reprodutibilidade dos

dados e inferência em classificações filogenéticas. Entretanto o equipamento necessário e seu alto custo são empecilhos para aplicação em campo, principalmente em países onde a cólera é endêmica (CHOKESAJJAWATEE *et al.*, 2008).

A capacidade para identificar a identidade clonal de isolados de bactérias tem importantes implicações tanto na epidemiologia quanto em estudos ecológicos gerais. Muitos surtos têm sido associados com clones distintos. As metodologias de tipagem molecular baseadas em PCR tem muitas vantagens em relação aos outros métodos, pois oferece simplicidade, com menor necessidade de instrumentação sofisticada. Com os iniciadores apropriados todo o genoma pode ser amostrado aleatoriamente e precisamente, gerando padrões robustos sem tendências para uma área específica. Assim, apesar das cepas Vp e Vc identificadas no presente trabalho não apresentarem os principais fatores de virulência, estas podem se transformar em potenciais reservatórios para genes de virulência, através da transferência lateral, gerando cepas potencialmente epidêmicas, sendo necessário, portanto programas de vigilância e monitoramento destas espécies em áreas propensas a grande atividade antrópica e ao desequilíbrio da flora natural, uma vez que estes são fatores cruciais para a emergência e re-emergência de doenças infecciosas de potencial pandêmico.

7 CONCLUSÕES

- Ambientes costeiros são extremamente vulneráveis às atividades antropogênicas, se tornando ambientes propícios para o surgimento e ressurgimento de doenças de potencial epidêmico, assim como observado em áreas com alto nível de degradação como Belém (PA), Paranaguá (PR) e Santos (SP).
- Membros da família *Vibrionaceae* são autóctones destes ambientes, sendo bastante numerosos em ambientes com maior nível de eutrofização.
- Os indicadores de contaminação fecal foram úteis para se avaliar o nível de atividade antropogênica em ambientes costeiros e portuários, no entanto foram inadequados para se avaliar a qualidade microbiológica da água de lastro devido sua baixa frequência e abundância.
- Os indicadores de contaminação fecal não foram apropriados para indicação da presença de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* tanto em ambientes costeiros, quanto em ambientes portuários e água de lastro.
- Foram observadas correlações positivas entre a contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae* (CV) e pH, contagem de vibrios em plâncton, CV e contagem de bactérias viáveis marinhas e CV e enterococos intestinais. Entretanto foram correlações pontuais, sendo necessária uma amostragem maior para confirmação destas.
- Os tanques de lastro dos navios se mostraram um ambiente desfavorável para o crescimento de bactérias visto que em todos os parâmetros microbiológicos foram observadas menores frequências do que em ambientes costeiros ou portuários.
- Apesar das baixas frequências dos parâmetros microbiológicos estes estiveram presentes em diversas amostras de água de lastro demonstrando serem resistentes a estas condições e portanto, podem oferecer risco em áreas do deslastre desta água.
- *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* são autóctones dos ambientes costeiros e portuários brasileiros, não oferecendo risco devido a ausência dos principais fatores associados à virulência. Entretanto, é importante o monitoramento da presença destas espécies, independentemente do sorotipo ou sorogrupo, patogenicidade, ou virulência devido à descoberta da transferência lateral de genes que pode ocorrer no ambiente aquático.

- A caracterização molecular de cepas de Vc e Vp isoladas de ambientes aquáticos, usando BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR, demonstrou similaridade menor de 70% entre as mesmas, o que mostra uma grande diversidade entre membros da mesma espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGÊNCIA NACIONAL DE TRANSPORTES AQUAVIÁRIOS. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.antaq.gov.br/Portal/estatisticas.asp>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Relatório Técnico. Estudo Exploratório para Identificação e Caracterização de Espécies Patogênicas em Água de Lastro em Portos Selecionados no Brasil**. Brasília, D. F., 2002. 131p.

ALAM, M. J.; TOMOCHIKA, K. I.; MIYOSHI, S. I.; SHINODA, S. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 208, n. 1, p. 83-87, 2002.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.**, v.59, n. 143-169, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ORGANIZATION. Microbiological examination. In:____. **Microbiological Examination of Water and Wastewater**, 20th ed. Washington, D.C. APHA, AWWA, WEF, 1998.

ANGEL, M. V. Biodiversity of the Pelagic Ocean. **Conserv. Biol.**, v. 7, n. 4, p. 760-772, 1993.

AONO, E.; SUGITA, H.; KAWASAKI, J.; SAKAKIBARA, H.; TAKAHASHI, T.; ENDO, K.; DEGUCHI, Y. Evaluation of the polymerase chain reaction method for identification of *Vibrio vulnificus* isolated from marine environments. **J. Food Prot.**, v. 60, n. 1, p. 81-83, 1997.

ARIAS, C. R.; MACIAN, M. C.; AZAR, R.; GARAY, E.; PUJALTE, M. J. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from seawater and shellfish of the western Mediterranean coast. **J. Appl. Microbiol.**, v. 43, p. 125-134, 1999.

ARIAS, C. R.; PUJALTE, M. J.; GARAY, E.; AZNAR, R. Genetic Relatedness among environmental, clinical, and diseased-eel *Vibrio vulnificus* isolates from different geographic regions by ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 9, p. 3403-3410, 1998.

***De acordo com:**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AUSTIN, B.; GARGES, S.; CONRAD, B.; HARDING, E. E.; COLWELL, R. R.; SIMIDU, U.; TAGA, N. Comparative study of the aerobic, heterotrophic bacterial flora of Chesapeake Bay and Tokyo Bay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, n. 4, p. 704-714, 1979.

AZAM, F. & WORDEN, A. Z. Oceanography. Microbes, molecules, and marine ecosystems. **Science**, v. 303, n. 5664, p. 1622-1624, 2004.

BAFFONE, W.; TARSI, R.; PANE, L.; CAMPANA, R.; REPETTO, B.; MARIOTTINI, G. L.; PRUZZO, C. Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties. **Environ. Microbiol.**, v. 8, n.7, p. 1299-1305, 2006.

BARBONI, S. A. **Ocorrência de *Vibrio* spp. Potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados no ano de 2000 a 2002 nos municípios da área de influencia da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia – Brasil, 2003.** f. 134-135. Tese (doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2003.

BARROS, L. M. O.; SOUSA, O. V.; LIMA, E. A.; MACRAE, A.; VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F. Vibrios sacarose negativos isolados de ostras *Crassostrea rhizophorae* comercializadas em barracas de Praia na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. **Bol. Téc. Cient. Cepnor**, v. 7, n. 1, p. 9 – 16, 2003.

BAUMMAN, P.; FURNISS, A. L.; LEE, J. V. Genus I. *Vibrio*. In: _____. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Ed. Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.518-538.

BAX, N.; WILLIAMSON, A; AGUERO, M.; GONZALEZ, E.; GEEVES. W. Marine invasive alien species: a threat to global biodiversity. **Marine Policy**, v. 27, p. 313–323, 2003.

BELAUSTEGUIGOITIA, J. C. Causal Chain Analysis and Root Causes: The GIWA Approach. **Ambio**, v. 33, n. 1–2, p. 7-12, 2004.

BIOSCA, E. G.; OLIVER, J. D.; AMARO, C. Phenotypic characterization of *Vibrio vulnificus* biotype 2, a lipopolysaccharide-based homogeneous O serogroup within *Vibrio vulnificus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 918-927, 1996.

BISHARAT, N.; AGMON, V.; FINKELSTEIN, R.; RAZ, R.; BEN-DROR, G.; LEMER, L.; SOBOH, S.; COLODNER, R.; CAMERON, D.N.; WYKSTRA, D.L.; SWERDLOW, D.L.; FARMER, J.J. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. **Lancet**, v. 354, p. 1424, 1999.

BHOWMICK, P. P.; KHUSHIRAMANI, P.; RAGHUNATH, P.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the south-west coast of India. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 46, p.198–204, 2008.

BLAKE, P. A.; WACHSMUTH, K.; DAVIS, B. R.; BOPP, C. A.; CHAIKEN, B. P.; LEE, J. V. Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strain from Mexico identical to United States isolates. **Lancet**, v. 12, n. 8355, p. 912, 1983.

BLAKE, P.A.; WEAVER, R.E.; HOLLIS, D. G. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 34, p. 341-67, 1980.

BLACKWELL, K. D. & OLIVER, J. D. The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina estuaries. **J. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 146-153, 2008.

BLOKESCH, M. & SCHOOLNIK, G. K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. **PLoS Pathog.**, v. 3, n. 6, s. 81, p. 0733- 0742, 2007.

BRAUNS, L. A.; HUDSON, M. C.; OLIVER, J. D. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 9, p. 2651-2655, 1991.

BULLEN, J. J.; SPALDING, P. B.; WARD, C. G.; GUTTERIDGE, J. M. Hemochromatosis, iron and septicemia caused by *Vibrio vulnificus*. **Arch. Intern. Med.**, v. 151, n. 8, p. 1606-1609, 1991.

BURKHOLDER, J. M.; HALLEGRAEFF, G. A.; MELIA, G.; COHEN, A.; BOWERS, H. A.; OLDACH, D. W.; PARROW, M. W.; SULLIVAN, M. J.; ZIMBA, P. V.; ALLEN, E. H.; KINDER, C. A.; MALLIN, M. A. Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of U.S. military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices. **Harmful Algae**, v. 6, p. 486–518, 2007.

BUTT, A. A.; ALDRIDGE, K. E.; SANDERS, C. V. Infections related to the ingestion of seafood Part I: Viral and bacterial infections. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 201-212, 2004.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P.; VAZOLLER, R. F.; PELLIZARI, V. H. **Diversidade no Domínio Bacteria**. 2006. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/pdf/v1cap01.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

CAVALLO, R. A.; STABILI, L. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). **Water Res.**, v. 36, n. 15, p. 3719-3726, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Surveillance for Waterborne Disease and Outbreaks Associated with Recreational Water — United States, 2003–2004. Surveillance Summaries. **MMWR**, v. 55, n. 12, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Vibrio illnesses after Hurricane Katrina—multiple states, August–September 2005. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.**, n. 54, p. 928-931, 2005.

CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION (CFSAN)/ FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Draft Risk Assessment on the Public Health Impact of *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Molluscan Shellfish.** FDA, 2000. 102 p.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Manual das Doenças transmitidas por alimentos e água – *Vibrio parahaemolyticus*.** 2003a. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Vibrio_parah.htm>. Acesso em: 15 mar. 2008.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Manual das Doenças transmitidas por alimentos e água – *Vibrio vulnificus*.** 2003b. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Vibrios_vul.htm>. Acesso em: 15 mar. 2008.

CERDÁ-CUÉLLAR, M.; JOFRE, J.; BLANCH, A. R. A selective medium and a specific probe for detection of *Vibrio vulnificus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 2, p. 855- 859, 2000.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo 2007.** Série Relatórios, CETESB, 2008. 294 p.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo 2004.** Série Relatórios, CETESB, 2005.

CETESB. São Paulo. **Vigilância da cólera no Estado de São Paulo.** Monitoramento em águas. Relatório final. São Paulo, 1997.

CHAI, T. E PACE, J. *Vibrio parahaemolyticus*. In: HUI, Y. H.; GORHAM, J. R.; MURREL, K. D.; CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne Disease handbook**. New York: Ed. Marcel Dekker, 1994. v. 1, p. 395-425.

CHAKRABORTY, S.; MUKHOPADHYAY, A. K.; BHADRA, R. K.; GHOSH, A. N.; MITRA, R.; SHIMADA, T.; YAMASAKI, S.; FARUQUE, S. M.; TAKEDA, Y.; COLWELL, R. R.; NAIR, G. B. Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 9, p. 4022-4028, 2000.

CHAN, K. Y.; WOO, M. L.; LO, K. W.; FRENCH, G. L. Occurrence and distribution of halophilic vibrios in subtropical coastal waters of Hong Kong. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 52, n. 6, p. 1407-1411, 1986.

CHANG, B.; TANIGUCHI, H.; MIYAMOTO, H.; YOSHIDA, S. Filamentous bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* as a possible clue to genetic transmission. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 19, p. 5094-5101, 1998.

CHEN, J. **Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus spp.*) comercializado na zona sul do município de São Paulo**. 68 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2004.

CHEN, C. Y.; WU, K. M.; CHANG, Y. C.; CHANG, C. H.; TSAI, H. C.; LIAO, T. L.; LIU, Y. M.; CHEN, H. J.; SHEN, A. B.; LI, J. C.; SU, T. L.; SHAO, C. P.; LEE, C. T.; HOR, L. I.; TSAI, S. F. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. **Genome Res.**, v. 13, n. 12, p. 2577-2587, 2003.

CHOI, H. K.; PARK, N. Y.; KIM, D.; CHUNG, H. J.; RYU, S.; CHOI, S. H. Promoter análisis and regulatory characteristics of *vvhBA* encoding cytolytic hemolysin of *Vibrio vulnificus*. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 49, p. 47292-47299, 2002.

CHOKESAJJAWATEE, N.; ZO, Y.; COLWELL, R. R. Determination of Clonality and Relatedness of *Vibrio cholerae* Isolates by Genomic Fingerprinting, Using Long-Range Repetitive Element Sequence-Based PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 17, p. 5392-5401, 2008.

CHUN, J.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 2202-2208, 1999.

COLAÇO, W.; SILVA FILHO, S. V.; RODRIGUES, D. P.; HOFER, E. *Vibrio cholerae* O1 em amostras de ambientes aquáticos e de alimentos analisados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.14, p. 465-471, 1998.

COLWELL, R. R. A global and historical perspectives of the Genus *Vibrio*. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C: ASM Press, 2006. p. 3-11.

COLWELL, R. R.; HUQ, A. Marine ecosystems and cholera. **Hydrobiologia**, v. 460, p. 141–145, 2001.

COLWELL, R. R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. **Science**, v. 274, p. 2025-2031, 1996.

COLWELL, R. R.; HUQ, A.; CHOWDHURY, M. A.; BRAYTON, P. R.; XU, B. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae*. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, n. 10, p. 946-950, 1995.

COLWELL, R. R. & SPIRA, W. M... The ecology of *Vibrio cholerae*, p. 107-127. In: D. BARUA, D. ; GREENOUH, W. B. **Cholera**. New York: Ed. Plenum, 1992

COLWELL, R. R.; BRAYTON, P. R.; GRIMES, D. J.; ROSZAK, D. B.; HUQ, A.; PALMER, L. M. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. **Biol. Technol.**, n. 3, p. 817– 820, 1985.

COLWELL, R. R.; KAPER, J.; JOSEPH, S. W. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. **Science**, v. 198, n. 4315, p. 394-396, 1977.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº357, 17 de Março de 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº274, 29 de Novembro de 2000.

CÓRDOVA, J. L.; ASTORGA, J.; SILVA, W.; RIQUELME, C. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 chilean outbreak. **Biol. Res.**, v. 35, p.433-440, 2002.

COSTA, A. M. Perfil de morbi-mortalidade por doenças relacionadas a um saneamento ambiental inadequado. *In: Impactos na saúde e no Sistema Único de Saúde relacionados a um saneamento ambiental inadequado*. Relatório da pesquisa. 2001.

COUTARD, F.; CRASSOUS, P.; DROGUET, M.; GOBIN, E.; COLWELL, R. R.; POMMEPUY, M.; HERVIO-HEATH, D. Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation? **ISME J.**, v. 1, n. 2, p. 111-120, 2007.

DADISMAN, T. A.; NELSON, R.; MOLEND, J. R.; GARBER, H. J. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland. Clinical and epidemiologic aspects. **Am. J. Epidemiol.**, v. 96, p. 414-418, 1972.

DARRIGRAN, G. El bivalve invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857); um problema para las tomas de agua dulce de las plantas potabilizadoras e industrias del Mercosur. *In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA*, 15, **Resumos**. Florianópolis, São Leopoldo, Unisinos, 1997p. 22.

DAVID, M.; PERKOVIC, M. Ballast water sampling as a critical component of biological invasions risk management. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 49, n. 4, p. 313-318, 2004.

DEPAOLA, A.; CAPERS, G. M.; ALEXANDER, D. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf Coast. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 3, p. 984-988, 1994.

DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWSKY, M. J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 6, p. 2572-2577, 2000.

DONOVAN, T. J. & VAN NETTEN, P. Culture media for the isolation and enumeration of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 26, n. 1, p. 77-91, 1995.

DRAKE, L. A.; DOBLIN, M. A.; DOBBS, F. C. Potential microbial bioinvasions via ships' ballast water, sediment, and biofilm. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 55, n. 7, p. 333-341, 2007.

DRAKE, L. A.; MEYER, A. E.; FORSBERG, R. L.; BAIER, R. E.; DOBLIN, M. A.; HEINEMANN, S.; JOHNSON, W. P.; KOCH, M.; RUBLEE, P. A.; DOBBS, F. C. Potential invasion of microorganisms and pathogens via 'interior hull fouling': biofilms inside ballast water tanks **Biol. Inv.**, v. 7, p. 969-982, 2005.

DRAKE, L. A.; RUIZ, G. M.; GALIL, B. S.; MULLADY, T. L.; FRIEDMANN, D. O.; DOBBS, F. C. Microbial ecology of ballast water during a transoceanic voyage and the effects of open-ocean exchange. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 233, p. 13-20, 2002.

DUMONTET, S.; KROVACEK, K.; BALODA, S.B.; GROTTOLI, R.; PASQUALE, V.; VANUCCI, S. Ecological relationship between *Aeromonas* and *Vibrio* spp. and planktonic copepods in the coastal marine environment in southern Italy. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, n. 3, p. 245-254, 1996.

EILERS, H.; PERNTHALER, J.; GLOCKNER, F. O.; AMANN, R. Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 7, p. 3044-3051, 2000.

ELLIOT, E. L.; KAYSNER, C. A.; JACKSON, L.; TAMPLIN, M. L. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. In: **Bacteriological Analytical Manual. FDA**. Gaithersburg: Ed. AOAC International, 1995. p. 9.01-9.27.

ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY (USA). **Method 1602**: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Ágar Layer (SAL) Procedure. EPA/USA, 2001. 38p.

FARMER, J. J. Revival of the name *Vibrio vulnificus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 30, p. 656, 1980.

FARUQUE, S. M. & NAIR, G. B. Epidemiology. P. 385-398. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The Biology of Vibrios**. Washington, D. C.: ASM Press, 2006.

FARUQUE, S.M.; ALBERT, M.J.; MEKALANOS, J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 1301-1314, 1998.

FIELDS, P. I.; POPOVIC, T.; WACHSMUTH, K.; OLSVIK, O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 8, p. 2118-2121, 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters**. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/008/a0252e/a0252e00.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ FISHERIES DEPARTMENT. **State of world aquaculture 2006**. FAO Fisheries Technical Paper. n° 500. Roma: FAO. 2006. 134 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hazard characterization for pathogens in food and water: guidelines.** (Microbiological risk assessment series, n. 3). Roma: FAO 2003. 61 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION /WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT CONSULTATION. **Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood.** Rome: FAO, 2002.

FRANCA, S. M. C.; GIBBS, D. L.; SAMUELS, P.; JOHNSON, D. *Vibrio parahaemolyticus* in Brazilian coastal waters. **J. Amer. Med. Ass.**, v. 244, p. 587-588, 1980.

FUENZALIDA, L.; HERNANDEZ, C.; TORO, J.; RIOSECO, M. L.; ROMERO, J.; ESPEJO, R. T. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. **Environ. Microbiol.**, v. 8, p. 675-683, 2006.

FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS (SÃO PAULO); SABESP. **Projeções para o estado de São Paulo: população e domicílios até 2025.** São Paulo, 2004.

KOELLE, K.; RODO, X.; PASCUAL, M.; YUNUS, M.; MOSTAFA, G. Refractory periods and climate forcing in cholera dynamics. **Nat. Lett.**, v. 436, n. 4, p. 696-700, 2005.

GARIBALDI, L. & LIMONGELLI, L. Trends in oceanic captures and clustering of Large Marine Ecosystems: two studies based on the FAO capture database. **FAO Fisheries Technical Paper. No. 435.** Rome: FAO. 2002. 71 p.

GELLI, D. S.; TACHIBANA, T.; SAKUMA, H. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em ostras. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 39, p. 61-66, 1979.

GEO BRASIL 2002. **Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil.** Brasília, D. F.: Edições IBAMA, 2002. 440 p.

GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP - JOINT GROUP OF EXPERTS ON THE SCIENTIFIC ASPECTS OF MARINE ENVIRONMENTAL PROTECTION) AND ADVISORY COMMITTEE ON PROTECTION OF THE SEA. **A sea of troubles.** Rep. Stud. GESAMP, n. 70, 2001. 35 p.

GIL, A. L.; MIRANDA, H.; LANATA, C. F.; PRADA, A.; HALL, E. R.; BARRENO, C. M.; NUSRIN, S.; BHUIYAN, N. A.; SACK, D. A.; NAIR, G. B. O3:K6 serotype of *Vibrio*

parahaemolyticus identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 11, n. 4, p. 324-328, 2007.

GONÇALVES, E. G. R.; LEAL, N. C.; HOFER, E. Estudo molecular de *Vibrio cholerae* não-O1 isolado de zooplâncton da Baía de São Marcos/São Luís – MA, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, p. 324-328, 2004.

GONZALEZ-ESCALONA, N.; CACHICAS, V.; ACEVEDO, C.; RIOSECO, M. L.; VERGARA, J. A.; CABELLO, F.; ROMERO, J.; ESPEJO, R. T. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 129-131, 2005.

GREER, A.; NG, V.; FISMAN, D. Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. **CMAJ**, v. 178, n. 6, p. 715-722, 2008.

GRIMES, D. J. Ecology of Estuarine Bacteria Capable of Causing Human Disease: A Review. **Estuaries**, v. 14, n. 4, p. 345-360. 1991.

GULIG, P. A.; BOURDAGE, K. L.; STARKS, A. M. Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **J. Microbiol.**, v. 4, p. 118-131, 2005.

HAAS, C.N.; ROSE, J. .B.; GERBA,, C. .P. **Quantitative microbial risk assessment**. New York: Ed. John Wiley & Sons, Inc. 1999.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLDORFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Mol. Microbiol.**, v. 23, n. 6, p. 1089-1097, 1997.

HALLEGRAEFF, G. M. Foreword. **Harm. Alg.**, v. 6, p. 461–464, 2007.

HALLEGRAEFF, G. M. & BOLCH, C. J. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. **J. Plankt. Res.**, v. 14, p. 1067–1084, 1992.

HALLEGRAEFF, G. M. & BOLCH, C. J. Transport of toxic dinoflagellate cysts via ships' ballast water. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 22, p. 27–30, 1991.

HANDA, S. **Cholera**. 2007. Disponível em:
<<http://www.emedicine.com/med/TOPIC351.HTM>>. Acesso em: 29 julh. 2008.

HALOW, K. D.; HARNER, R. C.; FONTENELLE, L. J. Primary skin infections secondary to *Vibrio vulnificus*: the role of operative intervention. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 183, n. 4, p. 329-334, 1996.

HAQ, S. M. & DAYAL, H. H. Chronic liver disease and consumption of raw oysters: a potentially lethal combination: a review of *Vibrio vulnificus* septicemia. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 100, n. 5, p. 1195-1199, 2005.

HARVELL, C. D.; KIM, K.; BURKHOLDER, J. M.; COLWELL, R. R.; EPSTEIN, P. R.; GRIMES, D. J.; HOFMANN, E. E.; LIPP, E. K.; OSTERHAUS, A. D.; OVERSTREET, R. M.; PORTER, J. W.; SMITH, G. W.; VASTA, G. R. Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. **Science**, v. 3, n. 285, p. 1505-1510, 1999.

HARWOOD, V. J.; GANHI, J. P.; WRIGHT, A. C. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oyster and environmental sources: a review. **J. Microbiol. Methods.**, v. 59, p. 301-316, 2004.

HEDLUNG, B. P. & STALEY, J. T. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 61-66, 2001.

HEIDELBERG, J. F.; HEIDELBERG, K. B.; COLWELL, R. R. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 11, p. 5488-5497, 2002.

HERNÁNDEZ, C.; ULLOA, J.; VERGARA, J. A.; ESPEJO, R.; CABELLO, F. *Vibrio parahaemolyticus* infections and algal intoxications as emergent public health problems in Chile. **Rev. Med. Chil.**, v. 133, n. 9, p. 1081-1088, 2005.

HERRINGTON, D. A.; HALL, R. H.; LOSONSKY, G.; MEKALANOS, J. J.; TAYLOR, K.; LEVINE, M. M. Toxin, toxin co-regulated pili and the *tox* R regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. **J. Exp. Med.**, v. 168, p. 1487-1492, 1988.

HLADY, W. G.; KLONTZ, K. C. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 1176-1183, 1996.

HOASHI, K.; OGATA, K.; TANIGUCHI, H.; YAMASHITA, H.; TSUJI, K.; MIZUGUCHI, Y.; OHTOMO, N. Pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus*: intraperitoneal and orogastric challenge experiments in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 34, n. 4, p. 355-366, 1990.

HOFER, E. & SILVA, C. H. D. Caracterização sorológica de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de peixes capturados no litoral brasileiro. **Rev. Microbiol.**, v. 17, p. 327-331, 1986.

HOFER, E. Primeiro isolamento e detecção de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. **Rev. Microbiol.**, v.14, n. 3, p.174-175, 1983.

HØI, L.; LARSEN, J. L.; DALSGAARD, I.; DALSGAARD, A. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 1, p.7-13, 1998.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual on determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins. 1994.

HONDA, T.; GOTO, I.; MINEMATSU, I.; IKEDA, N.; ASANO, N.; ISHIBASHI, M.; KINOSHITA, Y.; NISHIBUCHI, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T.. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *V. parahaemolyticus*. **Lancet**, v. 8528, p. 331-332, 1987.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M.. ERIC sequences: a novel repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other Enterobacteriaceae. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 825-834, 1991.

HUQ, A.; SMALL, E. B.; WEST, P. A.; HUQ, M. I.; RAHMAN, R.; COLWELL, R. R. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, n. 1, 275-283, 1983.

HUQ, A., RIVERA, I. N. G., R. R. COLWELL. Epidemiological Significance of Viable but Nonculturable Microorganisms. In: COLWELL, R. R. & GRIMES, D. J. (Ed). **Nonculturable Microorganisms in the Environment**. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. p. 301- 323.

HUSS, H. H.; ABABOUC, L; GRAM, L. Assessment and management of seafood safety and quality. **FAO Fisheries Technical Paper**. No. 444. Rome: FAO. 2003. 230 p.

INOUE, Y.; ONO, T.; MATSUI, T.; MIYASAKA, J.; KINOSHITA, Y.; IHN, H. Epidemiological survey of *Vibrio vulnificus* infection in Japan between 1999 and 2003. **J. Dermatol.**, v. 35, n. 3, p. 129-39, 2008

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in Foods 5: Microbiological Specifications of**

Pathogens. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Blackie Academic and Professional, New York. 1996.

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION (IMO). **Ballast water management.** Disponível em: < <http://www.imo.org> >. Acesso em: 20 mar. 2008.

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION. **International Convention for the Control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments, February 13, 2004.** London. Disponível em: <<http://www.imo.org>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

JEREK, B.; GILOT, P.; GUBINA, M.; KLUN, N.; MEHLE, J.; TCHERNEVA, E.; RIJPENS, N.; HERMAN, L. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence based PCR. **J. Clin. Microbiol.** , v. 37, n. 1, p. 103–109, 1999.

JIANG, S. C. & FU, W. Seasonal Abundance and Distribution of *Vibrio cholerae* in Coastal Waters Quantified by a 16S-23S Intergenic Spacer Probe. **Microb. Ecol.**, v. 42, n. 4, p. 540-548, 2001.

JIANG, X.; CHAI, T. J. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 4, p. 1300-1305, 1996.

JOACHIMSTHAL, E. L.; IVANOV, V.; TAY, J.-H.; TAY, S. T.-L. Flow cytometry and conventional enumeration of microorganisms in ships's ballast water and marine samples. **Mar. Pollution Bull.**, v. 46, p. 308-313, 2003.

JOHNSTON, M. D.; BROWN, M. H. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. **J. Appl. Microbiol.**, v. 92, n. 6, p. 1066-1077, 2002.

JOSEPH, S. W.; COLWELL, R. R.; KAPER, J. B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. **Crit. Rev. Microbiol.**; v. 10, n.1, p. 77-124, 1982.

JURAS, I. A. G. M. **Problemas causados pela água de lastro.** Consultoria Legislativa. Câmara dos Deputados, 2003.

KANEKO, T.; COLWELL, R. R. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. **J. Bacteriol.**, v. 113, n. 1, p. 24-32, 1973.

KARAOLIS, D. K.; JOHNSON, J. A.; BAILEY, C. C.; BOEDEKER, E. C.; KAPER, J. B.; REEVES, P. R. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, n. 6, p. 3134-3139, 1998.

KASPAR, C. W. & TAMPLIN, M. L. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 8, p. 2425-2429, 1993.

KAYSNER, C. A.; ABEYTA, C. JR.; TROST, P. A.; WETHERINGTON, J. H.; JINNEMAN, K. C.; HILL, W. E.; WEKELL, M. M. Urea hydrolysis can predict the potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in the Pacific Northwest. **Appl Environ Microbiol.**, v. 60, n. 8, p. 3020-3022, 1994.

KAYSNER, C. A.; ABEYTA, C. J.; WEKELL, M. M.; DEPAOLA, A.; STOTT, R. F.; LEITCH, J. M. Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 6, p. 1349-1351, 1987.

KENZAKA, T.; YAMAGUCHI, N.; TANI, K.; NASU, M. rRNA-targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. **Microbiology**, v. 144, n. 8, p. 2085-2093, 1998.

KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1473, n. 1, p. 108-22, 1999.

KHAN, A. A.; McCARTHY, S.; WANG, R.; CERNIGLIA, C. E. Characterization of United States outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR and development of a rapid PCR method for detection of O3:K6 isolates. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 206, p. 209-214, 2002.

KRIEG, N. R. & HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, v. 1, Baltimore: Eds. Williams and Wilkins. 1984.

LANDGRAF, M.; LEME, K. B. P.; GARCIA-MORENO, M. L. Occurrence of emerging pathogenic *Vibrio* spp in seafood consumed in Sao Paulo city, **Brazil. Rev. Microbiol.**, v. 27, p.126-130, 1996.

LHAFI, S. K.; KUHNE, M. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 116, n. 2, p. 297-300, 2007.

LEE, K-H. & RUBY, E. G. Effect of the squid host on the abundance and distribution of symbiotic *Vibrio fischeri* in nature. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 1565-1571, 1994.

LEVINE, W. C. & GRIFFIN, P. M. Gulf Coast *Vibrio* Working Group: *Vibrio* infections on the Gulf Coast: results of the first year of surveillance. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 479–483, 1993.

LINKOUS, D. A. & OLIVER, J. D. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 174, p. 207-214, 1999.

LIPP, E. K.; HUG, A.; COLWELL, R. R. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 757-770, 2002.

LOBITZ, B.; BECK, L.; HUQ, A.; WOOD, B.; FUCHS, G.; FARUQUE, A. S. G. & COLWELL, R. R. Climate and infectious disease: Use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement. **PNAS**, v. 97, n. 4, p. 1438–1443, 2000.

MACIAN, M. C.; ARIAS, C. R.; AZNAR, R.; GARAY, E.; PUJALTE, M. J. Identification of *Vibrio* spp. (other than *V. vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. **Int. Microbiol.**, v. 3, n. 1, p. 51-53, 2000.

MAGALHÃES, V.; LIMA, R. A.; TATENO, S.; MAGALHÃES, M. Gastroenteritis humanas associadas a *Vibrio parahaemolyticus* no Recife, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 33, n. 1, p. 64-68, 1991.

MAKINO, K.; OSHIMA, K.; KUROKAWA, K.; YOKOYAMA, K.; UDA, T.; TAGOMORI, K.; IJIMA, Y.; NAJIMA, M.; NAKANO, M.; YAMASHITA, A.; KUBOTA, Y.; KIMURA, S.; YASUNAGA, T.; HONDA, T.; SHINAGAWA, H.; HATTORI, M.; IIDA, T. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. **Lancet.**, v. 361, n. 9359, p. 743-749, 2003.

MALUPING, R. P.; RAVELO, C.; LAVILLA-PITOGO, C. R.; KROVACEK, K.; ROMALDE, J. L. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from the Philippines by PCR-based methods. **J. Appl. Microbiol.**, v. 99, p. 383–391, 2005.

MANZONI, G. O. C. **Cultivo de Mexilhões *Perna perna*: Evolução da atividade no Brasil e avaliação econômica da realidade de Santa Catarina**. 255 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2005.

MARQUES, M.; COSTA, M. F.; MAYORGA, M. I. O.; PINHEIRO, P. R. C. Water Environments: Anthropogenic Pressures and Ecosystem Changes in the Atlantic Drainage Basins of Brazil. **Ambio**, v. 33, n. 1–2, 2004a.

MARQUES, M.; KNOPPERS, B.; LANNA, A. E.; ABDALLAH, P. R.; POLETTE, M. **Brazil Current, GIWA Regional assessment 39**. Sweden: UNEP, 2004b. 175 p.

MARSHALL, S.; CLARK, C. G.; WANG, G.; MULVEY, M.; KELLY, M. T.; JOHNSON, W. M. Comparison of Molecular Methods for Typing *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 8, p. 2473-2478, 1999.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucl. Acids Res.**, v. 20, p. 3479-4383, 1992.

MARTIN, S. J.; SIEBELING, R. J. Identification of *Vibrio vulnificus* O serovars with antilipopolysaccharide monoclonal antibody. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 8, p.1684-1688, 1991.

MARTINS, M. T. A. **Ecologia de *Vibrio cholerae* no ecossistema aquático**. São Paulo. Tese (Livre Docência) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1988.

MARTINS, M. T.; SANCHEZ, P. S.; SATO, M. I. Z.; BRAYTON, P. R.; COLWELL, R. R. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment in Brazil employing direct immunofluorescence microscopy. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 9, n. 390-392, 1993.

MARUYAMA, A.; HONDA, D.; YAMAMOTO, H.; KITAMURA, K.; HIGASHIHARA, T. Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, n. 2, p. 835-846, 2000.

MATTE, G. R.; MATTE, M. H.; SATO, M. I.; SANCHEZ, P. S.; RIVERA, I. G.; MARTIN, S. M. T. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 77, n. 3, p. 281-287, 1994.

MAUGERI, T.L.; CARBONE, M.; FERA, M.T.; GUGLIANDOLO C. Detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in seawater and plankton of a coastal zone of the Mediterranean Sea. **Res Microbiol.**, v. 157, n. 2, p. 194-200, 2006.

MEIBOM, K. L.; LI, X. B.; NIELSEN, A. T. ; WU, C. Y. ; ROSEMAN, S.; SCHOOLNIK, G. K. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 101, n. 8, p. 2524-2529, 2004.

MERTENS, A.; NAGLER, J.; HANSEN, W.; GEPTS-FRIEDENREICH, E. Halophilic, lactose-positive *Vibrio* in a case of fatal septicemia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 9, n. 2, p. 233-235, 1979.

MCDUGALD, D. & KJELLEBERG, S. Adaptive responses of *Vibrios*. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C: ASM Press. 2006. p. 133-155.

MCFALL-NGAI, M. J. Negotiations between animals and bacteria: the 'diplomacy' of the squid-vibrio symbiosis. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 126, p. 471-480, 2000.

MELO, M. T.; VIEIRA, R. H.; SAKER-SAMPAIO, S.; HOFER, E. Coliforms and *Salmonella* in seawater near to domestic sewage sources in Fortaleza (Ceará, Brazil). **Microbiologia**, v. 13, p. 463-470, 1997.

MIMURA, H.; KATAKURA, R.; ISHIDA, H. Changes of microbial populations in a ship's ballast water and sediments on a voyage from Japan to Qatar. **Mar Pollut Bull.** v. 50, n. 7, p. 751-757, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2008. **Cólera**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27388>. Acesso em: 15 mar. 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. PROGRAMA NACIONAL DO MEIO AMBIENTE II. **Relatório de Atividades 2000-2004**. <http://www.mma.gov.br/estruturas/pnma/_arquivos/pnma_ii_2000_a_2004.pdf>. Acesso em: 15mar. 2008.

MILLER, C. J.; DRASAR, B. S.; FEACHEM, R. G. Response of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 to physico-chemical stresses in aquatic environments. **J. Hyg.**, v. 93, n. 3, p. 475-495, 1984.

MIZUNOE, Y.; WAI, S. N.; ISHIKAWA, T.; TAKADE, A.; YOSHIDA, S. Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 186, n.1, p. 115-200, 2000.

MIYOSHI, S. *Vibrio vulnificus* infection and metalloprotease. **J. Dermatol.**, v. 33, n. 9, p. 589-595, 2006.

MOUZIN, E.; MASCOLA, L.; TORMEY, M. P.; DASSEY, D. E. Prevention of *Vibrio vulnificus* infections. Assessment of regulatory educational strategies. **JAMA**, v. 278, n. 7, p. 576-578, 1997.

MOTES, M. L.; DEPAOLA, A.; COOK, D. W.; VEAZEY, J. E.; HUNSUCKER, J. C.; GARTHRIGHT, W. E.; BLODGETT, R. J.; CHIRTEL, S. J.. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in northern Gulf and Atlantic coast oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 1459–1465, 1998.

NAGASAWA, S. & TERAZAKI, M. Bacterial epibionts of the deep-water copepod *Calanus cristatus* Kroyer. **Oceanol. Act.**, v.10, p. 475-479, 1987.

NAIR, G. B.; RAMAMURTHY, T.; BHATTACHARYA, S. K.; DUTTA, B.; TAKEDA, Y.; SACK, D. A. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 39-48, 2007.

NISHIBUCHI, M. Miscellaneous Human Pathogens. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C: ASM Press. 2006. p. 367-81.

NISHIGUCHI, M. K. & JONES, B. W. Microbial biodiversity within the *Vibrionaceae*. In: **Origins, Evolution, and the Biodiversity of Microbial Life**. Netherlands: Ed. J. Seckback Kluwer. 2004.

NISHIGUCHI, M. K.; NAIR, V. S. Evolution of symbiosis in the *Vibrionaceae*: a combined approach using molecules and physiology. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, n. 6, p. 2019-2026, 2003.

NISHIBUCHI, M. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from southeast Asian travelers arriving in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 3150-3155, 1997.

NISHIBUCHI, M. e KAPER, J. B. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. **Mol. Microbiol.**, v. 4, n. 1, p. 87-99. Published erratum appears in *Mol. Microbiol.*, v. 4, n. 7, p. 1225, 1990.

NISHIMURA, M.; KOGURE, K.; KITA-TSUKAMOTO, K.; OHWADA, K. Detection and direct count of specific bacteria in natural seawater using 16S rRNA oligonucleotide probes. **Bull. J. Soc. Microb. Ecol.**, v. 10, n. 3, p. 109-113, 1995.

O'DOR, R. K. **The Unknown Ocean**: The Baseline Report of the Census of Marine Life Research Program. Washington D. C.: Consortium for Oceanographic Research and Education, 2003. 28 p.

OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; HAYAKAWA, E.; NISHINO, T.; TAKEDA, Y.; MUKHOPADHYAY, A. K.; GARG, S., BHATTACHARYA, S. K.; NAIR, G. B. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 12, p. 3150-3155, 1997.

OLIVE, D. M. e BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1661–1669, 1999.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. p. 349-366. In: Thompson, F. L.; Austin, B.; Swings, J. **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C: ASM Press. 2006.

OLIVER, J. D.; HITE, F.; MCDOUGALD, D.; ANDON, N. L.; SIMPSON, L. M. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 7, p. 2624-2630, 1995.

OLIVER, J. D. **Food-borne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989.

OLIVER, J. D.; WARNER, R. A.; CLELAND, D. R. Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 985-998, 1983.

OLIVER, J. D.; WARNER, R. A.; CLELAND, D. R. Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine vibrios in coastal waters of the southeastern United States. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 1404-1414, 1982.

O'NEILL, K. R.; JONES, S. H.; GRIMES, D. J. Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n.10, p. 3257-3262, 1992.

OSAWA, R.; OKITSU, T.; MOROZUMI, H.; YAMAI, S. Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p.725-727, 1996.

OTTAVIANI, D.; LEONI, F.; ROCCHEGIANI, E.; SANTARELLI, S.; CANONICO, C.; MASINI, L.; DITRANI, V.; CARRATURO, A. First clinical report of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 infection in Italy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 6, p. 2144-2145, 2008.

PACHECO, D. Brasil investe no futuro da aquicultura e pesca. **Rev. Nac. C.**, v. 28, n. 326, p. 18-23, 2004.

PASTORINO, G.; DARRIGRAN, G.; MARTIN, S.; LUNASCHI, L. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor em águas del rio de La Plata. **Neot. La Plata**, v. 39, p. 34, 1993.

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

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 591-595, 2004.

PEREIRA, C. S. **A cultura de mexilhões na Baía de Guanabara e suas implicações para a Saúde Pública - Contexto Político-Social e Microbiológico**. 176 f. Tese (doutorado) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2003.

PFEFFER, C. S.; HITE, M. F.; OLIVER, J. D. Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of eastern North Carolina. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 6, p. 3526-3531, 2003.

PETERKIN, P. I. New Pathogens of interest in Food: *Vibrio vulnificus*. **Rev. Microbiol.**, v. 25, n. 3, p. 137-143, 1994.

POND, K. **Water recreation and disease. Plausibility of Associated Infections: Acute Effects, Sequelae and Mortality** (Emerging issues in water and infectious diseases series). WHO, 2005. 239 p.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious Outbreaks Associated with Bivalve Shellfish Consumption: A Worldwide Perspective. **Clin. Infect. Dis.**, n. 35, p.921-928, 2002.

PROENÇA, C. E. M. **Programa Nacional da Competitividade e a Sustentabilidade da Cadeia do Cultivo do Molusco Bivalvos**. Brasília, D. F.: Departamento de Pesca e Aqüicultura. MA. 1999. 32p.

PRUZZO, C.; GALLO, G.; CANESI, L. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. **Environ. Microbiol.**, v. 7, n. 6, p. 761-772, 2005.

QUILICI, M. L.; ROBERT-PILLOT, A.; PICART, J.; FOURNIER, J. M. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 1148-1149, 2005.

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, I.; VAUTERIN, P.; DE BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA DNAhomology studies: *Xanthomonas* as a model system. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 665–677, 2000.

RADJASA, O. K.; URAKAWA, H.; KITA-TSUKAMOTO, K.; OHWADA, K. Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from the northwestern Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA analysis. **Mar. Biotechnol.** v. 3, n. 5, p. 454-462, 2001.

RAGUENES, G.; CHRISTEN, R.; GUEZENNEC, J.; PIGNET, P.; BARBIER, G. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete Annelid, *Alvinella pompejana*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 47, n. 4, p. 989-995, 1997.

RAMAIAH, N.; KENKRE, V. D.; VERLECAR, X. N. Marine environmental pollution stress detection through direct viable counts of bacteria. **Wat. Res.**, v. 36, p. 2383–2393, 2002.

RAMAIAH, N.; HILL, R. T.; CHUN, J.; RAVEL, J.; MATTE, M. H.; STRAUBE, W. L.; COLWELL, R. R. Use of a *chiA* probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay. **FEMS Microb. Ecol.**, v. 3, p. 63-71, 2000.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRIJSPEERDT, K.; ZUTTER, L.; HEYNDRICKX, M. Comparison of Five Repetitive-Sequence-Based PCR Typing Methods for Molecular Discrimination of *Salmonella enterica* Isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 3615-3623, 2005.

RAY, G. C. Coastal-zone Biodiversity Patterns. **BioScience**, v. 41, p. 490-498, 1991.

RIGBY, G. R.; HALLEGRAEFF, G. M.; SUTTON, C. Novel ballast water heating technique offers cost effective treatment to reduce the risk of global transport of harmful marine organisms **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 191, p. 289-293, 1999.

RISTORI, C. A.; IARIA, S. T.; GELLI, D. S.; RIVERA, I. N. G. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliensis*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **Int. J. Environ. Health. Res.**, v. 17, n. 4, p. 259 – 269, 2007.

RIVERA, I. N. G.; LIPP, E. K.; GIL, A.; CHOOPUN, N.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. **Environ. Microbiol.**, v. 5, p. 599-606, 2003.

RIVERA, I. N. G.; CHUN, J.; HUQ, A.; SACK, R. B.; COLWELL, R. R. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 6, p. 2421-2429, 2001.

RIVERA, I. N. G. e RUBIN, A. **Biodiversidade de *Vibrio cholerae* isolados de ambientes aquáticos e zooplâncton (classe Copépoda) em duas regiões do Brasil**. CEBIMar – Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo. Relatório. 1997.

RIVERA, I. N. G. Aspectos **moleculares de *Vibrio cholerae* O1 e não O1 e relação entre amostras isoladas na fase pré e epidêmica durante a sétima pandemia**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995a.

RIVERA, I. G.; CHOWDHURY, M. A. R.; HUQ, A.; JACOBS, D.; MARTINS, M. T.; COLWELL, R. R. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and non- O1 strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2898-2904, 1995b.

RODRIGUES, D. P. e HOFER, E. *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Itaguaí Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 332-338, 1986.

ROSE, J. B.; EPSTEIN, P. R.; LIPP, E. K.; SHERMAN, B. H.; BERNARD, S. M.; PATZ, J. A. Climate variability and change in the United States: potential impacts on water- and foodborne diseases caused by microbiologic agents. **Environ. Health Perspect.** v. 2, s.109, p. 211-221, 2001.

ROSSELLÓ-MORA, R. & AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

ROSZAK, D. B. & COLWELL, R. R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiol. Rev.**, v. 51, n. 3, p. 365-379, 1987.

RUBY, E. G.; GREENBERG, E. P.; HASTINGS, J. W. Planktonic Marine Luminous Bacteria: Species Distribution in the Water Column. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 302-306, 1980.

RUBY, E. G. & NEALSON, K. H. Symbiotic associations of *Photobacterium fischeri* with the marine luminous fish *Monocentris japonica*: a model of symbiosis based on bacterial studies. **Biol. Bull.**, v. 151, p. 574-586, 1976.

RUIZ, G. M.; RAWLINGS, T. K.; DOBBS, F. C.; DRAKE, L. A.; MULLADY, T.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Global spread of microorganisms by ships. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 49-50, 2000.

SACK, D. A.; SACK, R. B.; NAIR, G. B.; SIDDIQUE, A. K. Cholera. **Lancet**, v. 363 n. 9404, p. 223-233, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SECHI, L. A.; DUPRE, I.; DERIU, A.; FADDA, G.; ZANETTI, S. Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, n. 3, p. 475-81, 2000.

SECRETÁRIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de qualidade ambiental do Estado de São Paulo. Informações referentes a 2005**. SMA/SP. 2006. 498 p.

SECRETÁRIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA (SEAP/PR). **Programa nacional de desenvolvimento da maricultura em águas da União**. SEAP/PR. Brasília, 2004. 38 p.

SHANDERA, W. X.; HAFKIN, B.; MARTIN, D. L.; TAYLOR, J. P.; MASERANG, D. L.; WELLS, J. G.; KELLY, M.; GHANDI, K.; KAPER, J. B.; LEE, J. V.; BLAKE, P. A. Persistence of cholera in the United States. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 4, p. 812-817, 1983

SHUVAL, H. Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. **J. Wt. Health**, v. 1, n.2, p. 53-64, 2003.

SILVA, J. S. V.; FERNANDES, F. C.; SOUZA, R. C. C. L.; LARSEN, K. T. S.; DANELON, O. M. Água de lastro e bioinvasão. In: Silva, J. S. V. & Souza, R. C. C. L. **Água de lastro e Bioinvasão**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. 2004. p. 1-10.

SILVA, J. S. V.; FERNANDES, F. C.; LARSEN, K. T. S.; SOUZA, R. C. C. L. Água de lastro – Ameaça aos ecossistemas. **Ciênc. Hj.**, v. 32, p. 39-43, 2002.

SIMIDU, U. e TSUKAMOTO, K. A method of the seletive isolation and enumeration of marine *Vibrionaceae*. **Microbial. Ecol.**, v. 6, p. 181-184, 1980.

SIMIDU, U.; KANEKO, E.; TAGA, N. Microbiological studies of Tokyo Bay. **Microb. Ecol.** v. 3, p. 173-191, 1977.

SMITH, G. D. Behind the Broad Street pump: aetiology, epidemiology and prevention of cholera in mid-19th century Britain [commentary]. **Int. J. Epidemiol.**, v. 31, p. 920–932, 2003.

SMITH, D. L.; WONHAM, M. J.; MCCANN, L. D.; RUIZ, G. M.; HINES, A. H.; CARLTON, J. T. Invasion pressure to a ballast-flooded estuary and an assessment of inoculant survival. **Biol. Inv.**, v. 1, p. 67–89, 1999.

SIMPSON, L. M.; WHITE, V. K.; ZANE, S. F.; OLIVER, J. D. Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 269-272, 1987.

SOCHARD, M. R.; WILSON, D. F.; AUSTIN, B.; COLWELL, R. R. Bacteria Associated with the Surface and Gut of Marine Copepods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, n. 4, p. 750-759, 1979.

SOUSA, O, V.; VIEIRA, R. H. S. F.; MENEZES, F. G. R.; REIS, C., M. F.; HOFER, E. DETECTION OF *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó river estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 46, n.2, p. 59-62, 2004.

SOUZA, K. M. C. **Qualidade microbiológica de água de lastro de navios, água e bivalves da região portuária brasileira, com ênfase na detecção de *Vibrio cholerae* O1**. 198f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SOUZA, R. C. C. L.; FERNANDES, F. C.; DANELON, O. M.; LARSEN, K. T. S.; SILVA, J. S. V.; COLLICHIO, F.; RAPAGNÁ, L. Metodologia de amostragem dos organismos transportados e água de lastro dos navios mercantes. **Pesq. Nav.**, v. 14, n. 221-235, 2001.

STERN, M. J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v. 37, p. 1015–1026, 1984.

STROM, M. S. e PARANJPYE, R. N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Microb. Infect.**, v. 2, n. 2, p. 177-188, 2000.

SUTHIENKUL, O.; ISHIBASHI, M.; IIDA, T.; NETTIP, N.; SUPAVEJ, S.; EAMPOKALAP, B.; MAKINO, M.; HONDA, T. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. **J. Infect. Dis.**, v. 172, n. 5, p. 1405-1408, 1995.

TAGOMORI, K.; IIDA, T.; HONDA, T. Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 16, p. 4351-4358, 2002.

TAMPLIN, M.; RODRICK, G. E.; BLAKE, N. J.; CUBA, T. Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 1466-1470, 1982.

TAMPLIN, M. L.; GAUZENS, A. L.; HUQ, A.; SACK, D. A.; COLWELL, R. R. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 6, p. 1977-1980, 1990.

TANTILLO, G. M.; FONTANAROSA, M.; DiPINTO, A.; MUSTI, M. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 117-126, 2004.

THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; VICENTE, A. C. P.; SWINGS, J. Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of *atpA* gene sequences. **Int. J. System. Evolution. Microbiol.**, v. 57, p. 2480–2484, 2007.

THOMPSON, J.R. e POLZ, M. F. Dynamics of *Vibrio* Populations and their role in environmental nutrient cycling, p.190-203. In: Thompson, F. L.; Austin, B.; Swings, J. **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C: ASM Press. 2006.

THOMPSON, J. R.; PACOCHA, S.; PHARINO, C.; KLEPAC-CERAJ, V.; HUNT, D. E.; BENOIT, J.; SARMA-RUPAVTARM, R.; DISTEL, D. L.; POLZ, M. F. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1311-1313, 2005.

THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; VICENTE, A. C. P.; THEOPHILO, G. N.D.; HOFER, E.; SWINGS, J. Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1946-1950, 2003.

TORRES, L.; ESCOBAR, S.; LÓPEZ, A. I.; MARCO, M. L.; POBO, V. Wound Infection due to *Vibrio vulnificus* in Spain. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 21, n. 7, p. 537-538, 2002.

UNEP. **Marine and coastal ecosystems and human well being: A synthesis report based on the findings of the Millennium Ecosystem Assessment**. UNEP. 2006. 76 p.

UNITED NATIONS. 2008. **Atlas of Oceans**. Disponível em: <<http://www.oceansatlas.org>>. Acesso em: 10 mar. 2008

UNITED NATIONS. **Water: a shared responsibility. The United Nations world water development report 2**. UNESCO-WWAP. 2006. 584 p.

URAKAWA, H. e RIVERA, I. N. G. Aquatic Environment. *In*: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C: ASM Press, 2006. p. 175-189.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. **Draft Risk Assessment on the Public Health Impact of *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Molluscan Shellfish**. 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/vprisk1.html>>. Acesso em: 15mar. 2008.

VARNAM, A. H. e EVANS, M. G. **Environmental Microbiology**. Washington, D. C.: ASM Press, 2000. 160p.

VEENSTRA, J.; RIETRA, P. J.; COSTER, J. M.; SLAATS, E.; DIRKS-GO, S. Seasonal variations in the occurrence of *Vibrio vulnificus* along the Dutch coast. **Epidemiol. Infect.**, v. 112, n. 2, p. 285-290, 1994.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **N. Ac. Res.**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; EVANGELISTA, N. S. S.; THEOPHILO, G. N. D.; REIS, E. M. F. Colimetry of marine water of Fortaleza (Ceará State, Brazil) and detection of enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Int. Microbiol.**, v. 1, p. 221-224, 1998.

VIEIRA, V. V.; TEIXEIRA, L. F.M.; VICENTE, A. C. P.; MOMEN, H.; SALLES, C. A. Differentiation of environmental and clinical isolates of *Vibrio mimicus* from *Vibrio cholerae* by multilocus enzyme electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 2360-2364, 2001.

VOLLBERG, C. M.; HERRERA, J. L. *Vibrio vulnificus* infection: an important cause of septicemia in patients with cirrhosis. **South. Med. J.**, v. 90, n. 10, p. 1040-1042, 1997.

WAI, S. N.; MIZUNOE, Y.; YOSHIDA, S. I. How *Vibrio cholerae* survive during starvation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 123-131, 1999.

WACHSMUTH, I. K.; EVINS, G. M.; FIELDS, P. I.; OLSVIK, O.; POPOVIK, T.; BOPPO, C. A.; WELLS, J. G.; CARILLO, C.; BLAKE, P. A. The molecular epidemiology of cholera in Latin America. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 621-626, 1993.

WALDOR, M. K. e MEKALANOS, J. J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, v. 272, n. 5270, p. 1910-1914, 1996.

WALDOR, M. K. e MEKALANOS, J. J. ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 1, p. 72-78, 1994.

WONG, H. C. e LIN, C. H. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 4233-4240, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global epidemics and impact of cholera.** Disponível em: < <http://www.who.int/topics/cholera/impact/en/index.html>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control.** Geneva: World Health Organization, 2007a. 147 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2007: a safer future: global public health security in the 21st century**. Geneva: World Health Organization, 2007b. 72 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet N°107 - Revised September 2007**. 2007c. Disponível em:<: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Task force on cholera control. Oral cholera vaccine use in complex emergencies: what next? - Report – WHO meeting 2005**. Geneva: World Health Organization, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Using Climate to predict infectious disease outbreaks: a review**. Geneva: World Health Organization, 2004. 55 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Emerging issues in water and infectious diseases..** Geneva: World Health Organization. 2003a. 22 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases**. Geneva: World Health Organization. 2000.

XU, H-S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, F. L.; ATTWELL, R. W.; GRIMES, D. J.; COLWELL, R. R. Survival and Viability of Nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the Estuarine and Marine Environment. **Microb. Ecol.**, v. 8, p. 313-323, 1982.

YEUNG, P. S.; BOOR, K. J. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 1, n. 2, p. 74-88, 2004.

YOSHIDA, S.; OGAWA, M.; MIZUGUCHI, Y. Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. **Infect. Immun.**, v. 47, n. 2, p. 446-451, 1985.

ZO, Y.-G.; RIVERA, I. N. G.; RUSSEK-COHEN, E.; ISLAM, M. S.; SIDDIQUE, A. K.; YUNUS, M.; SACK, R. B.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Genomic profiles of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* O1 in cholera-endemic areas of Bangladesh. **PNAS**, v. 99, p. 12409-12414, 2002.

ZOBELL, C. E. **Marine Microbiology**. Waltham: Ed Chronica Botanica Company.

ANEXOS

Local	Data	Ponto	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos													
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/ 100mL)	EI (UFC/100 mL)	COL (UFP/ 100mL)	CV/AS (UFC/mL)	CV/ TCBS (UFC/mL)	CV/TCBS (UFC/mL)	CV/MB (UFC/20 mL)	CV/P (UFC/g)	CV/B (UFC/g)	<i>Vibrio</i> <i>spp.</i>	Vc	Vp	Vv
Santos/ P1- 23°08'56"S, 46°37'10"W/ P2- 24°02'25"S, 46°32'83"W/ P3- 23°08'62"S, 46°31'33"W	fev/06	P1	26,5	7,5	42,2	27,2	9,1E+04	1,3E+03	3,8E+01	4,0E+01	4,6E+02	9,0E+01	>3600	>3600	<1	*	5	2(A)	3(A)	0
		P2	26,5	8	42,7	27,8	2,0E+05	3,8E+02	1,2E+01	<1	1,0E+02	1,3E+02	>3600	>3600	1,1E+06	*	0	0	0	0
		P3	26	8	42,3	27,2	1,4E+05	3,0E+03	4,9E+01	5,5E+01	3,4E+02	2,1E+01	3,6E+01	3,6E+01	1,8E+06	*	1	0	0	0
		Bivalve	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	8,4E+03	0	0	0	0
	mar/06	P1	19,6	7	31,8	19,7	1,7E+05	3,6E+03	<1	4,0E+02	6,9E+02	3,5E+02	8,0E+02	8,0E+02	8,7E+04	*	5	1(A)	1(A)	0
		P2	21,1	7	48,7	31,3	1,5E+05	3,2E+02	<1	1,0E+01	9,0E+01	1,7E+01	5,4E+02	5,4E+02	7,0E+04	*	1	0	1(P)	0
		P3	24	6,5	39,6	24,8	4,4E+05	8,4E+03	<1	2,3E+02	1,5E+03	3,6E+02	9,6E+02	9,6E+02	5,3E+04	*	2	0	0	0
		Bivalve	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3,8E+03	1	0	0	0
	abr/06	P1	26,7	7,5	48	31,3	9,7E+04	2,0E+01	<1	6,5E+01	3,1E+02	4,7E+01	8,2E+02	8,2E+02	8,4E+04	*	4	0	0	0
		P2	26,2	7,5	48,8	31,8	2,7E+05	4,0E+00	<1	3,0E+01	8,9E+01	1,2E+01	1,2E+03	1,2E+03	9,8E+04	*	6	0	5(A)/1(P)	0
		P3	26,7	7	43,3	27,7	2,5E+05	9,8E+01	<1	1,0E+02	1,7E+02	2,1E+01	5,1E+02	5,1E+02	3,0E+05	*	1	0	0	0
		Bivalve	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3,5E+03	1	0	1	0
	jun/06	P1	23	7	44	28,5	1,2E+05	3,6E+02	1,0E+01	3,0E+01	4,8E+02	6,6E+01	3,4E+02	3,4E+02	2,7E+03	*	8	0	2(A)	0
		P2	22,8	8	48,7	31,4	1,5E+05	2,0E+00	1,0E+00	2,0E+01	3,5E+02	1,4E+01	1,0E+02	1,0E+02	2,2E+03	*	10	0	2(A)/1(P)	0
		P3	21,6	7	45,3	29,1	2,2E+05	5,4E+02	2,6E+01	3,5E+01	4,3E+02	5,2E+01	3,6E+02	3,6E+02	4,3E+03	*	5	0	0	0
		Bivalve	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	8,1E+02	0	0	0	0

Anexo A – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em Santos, região costeira do Estado de S. Paulo.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; EI= Enterococos intestinais; COL=Colifagos; CV= Contagem de membros presuntivos da família Vibrionaceae; UFC= Unidade Formadora de Colônia; UFP= Unidade Formadora de Placa; AS= Ágar Simidu-Tsukamoto; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*; A= Água

Local	Data	Ponto	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos												
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin.‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	EI (UFC/100 mL)	COL (UFP/100mL)	CV/AS (UFC/mL)	CV/TCBS (UFC/mL)	CV/MB (UFC/20 mL)	CV/P (UFC/g)	CV/B (UFC/g)	Vibrio spp.	Vc	Vp	Vv
Sao Sebastiao/ P1- 23°49'50"S, 45°25'20"W/ P2- 23°49'56"S, 45°25'51"W	fev/06	P1	26,3	7	44	28,8	3,4E+05	2,8E+02	2,1E+02	5,0E+00	2,0E+01	3,5E+01	1,4E+02	2,4E+04	*	11	1(A)	2 (A)/ 5 (P)	0
		P2	25,9	7	47,7	31,1	7,4E+04	4,6E+01	<1	1,0E+00	2,1E+01	4,6E+01	2,4E+02	6,0E+04	*	9	0	1 (P)	0
		Bivalve	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1,1E+06	9	0	8	0
	mar/06	P1	28	7,5	45,9	35	8,5E+03	1,0E+00	<1	<1	9,0E+00	1,1E+01	1,4E+02	2,5E+04	*	6	0	4(P)	0
		P2	28	7,5	45,6	35	5,4E+03	4,0E+00	<1	<1	1,4E+01	6,0E+00	7,0E+01	3,4E+04	*	3	0	1(A)	0
		Ostra	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1,2E+03	2	0	0	0
	abr/06	P1	26,7	7,5	50,2	33	5,9E+03	<1	<1	<1	2,0E+01	3,9E+01	9,4E+02	2,0E+05	*	4	1(A)	2(A)	0
		P2	27,3	8	50,1	32,9	1,4E+04	<1	<1	<1	1,0E+01	2,7E+01	5,3E+02	8,0E+05	*	3	0	0	0
		Bivalve	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1,9E+03	2	0	2	0
	mai/06	P1	25	7	33,2	19,3	8,7E+03	<1	<1	<1	1,0E+01	4,0E+00	8,4E+01	1,1E+06	*	3	0	0	0
		P2	24,2	7,5	47	30,5	8,2E+03	<1	<1	<1	5,0E+00	4,0E+00	1,2E+02	1,2E+06	*	2	0	0	0
		Bivalve	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	4,7E+02	3	0	3	0

Anexo B – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em São Sebastião, região costeira do Estado de S. Paulo.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; EI= Enterococos intestinais; COL=Colifagos; CV= Contagem de membros presuntivos da família Vibrionaceae; UFC= Unidade Formadora de Colônia; UFP= Unidade Formadora de Placa; AS= Ágar Simidu-Tsukamoto; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*; A= Água

Local	Data	Ponto	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos												
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin.‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	EI (UFC/100mL)	COL (UFP/100mL)	CV/AS (UFC/mL)	CV/TCBS (UFC/mL)	CV/MB (UFC/20 mL)	CV/P (UFC/g)	CV/B (UFC/g)	<i>Vibrio</i> spp.	Vc	Vp	Vv
Ubatuba / P1-23°30'02"S, 45°07'07"W / P2- 23°30'41"S, 45°06'04"W	fev/06	P1	31,8	7,5	46,3	30,3	9,2E+04	<1	<1	<1	4,2E+01	4,5E+01	2,8E+02	8,4E+04	*	3	0	1(A)/1(P)	0
		P2	28,5	7,5	47,7	31,2	2,0E+04	<1	<1	<1	2,0E+01	1,0E+02	1,0E+02	6,9E+03	*	7	1(P)	2(A)/3(P)	0
		Bivalve	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1,2E+03	1	1	0	0
	mar/06	P1	27	7	47,6	30,3	9,8E+03	<1	<1	<1	7,8E+01	2,7E+01	6,0E+02	4,9E+05	*	2	0	2(A)	0
		P2	27	7,5	49,9	31,7	2,8E+03	<1	<1	<1	7,0E+00	1,0E+00	3,9E+01	6,4E+04	*	0	0	0	0
		Bivalve	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	2,1E+05	2	0	1	0
	mai/06	P1	25,3	7	ND	ND	2,0E+03	<1	<1	<1	1,0E+01	9,0E+00	2,0E+02	7,3E+04	*	4	0	1(A)	0
		P2	27	7,5	49,9	31,7	4,3E+03	<1	<1	<1	2,0E+01	1,6E+01	6,1E+02	8,0E+05	*	9	0	2(A)	0
		Bivalve	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1,8E+03	3	0	0	0

Anexo C – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em Ubatuba, região costeira do Estado de S. Paulo.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; EI= Enterococos intestinais; COL=Colifagos; CV= Contagem de membros presuntivos da família Vibrionaceae; UFC= Unidade Formadora de Colônia; UFP= Unidade Formadora de Placa; AS= Ágar Simidu-Tsukamoto; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*; A= Água

Local	Data	Ponto	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos								
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	EI (UFC/100mL)	CV (UFC/mL)	CVP (UFC/g)	Vibrio spp.	Vc	Vp	Vv
Belém (PA)	10-set-02	P1	30	NF	93,9	0	>65000	2,9E+03	1,0E+02	3,3E+02	6,6E+03	0	0	0	0
		P2	30	NF	82,6	0	>65000	>20000	4,0E+01	1,6E+03	8,5E+03	0	0	0	0
		P3	29	NF	83,9	0	>65000	>20000	5,2E+01	2,8E+02	1,4E+03	0	0	0	0
		P4	29	NF	93,8	0	>65000	5,2E+03	2,2E+01	3,5E+02	1,1E+04	0	0	0	0
		P5	30	NF	80,5	0	>65000	>20000	2,0E+01	4,9E+02	8,6E+04	1	0	0	0
		P6	29	NF	313	0,1	>65000	4,0E+02	4,0E+00	5,1E+02	8,1E+04	2(P)	0	0	0
Fortaleza (CE)	13-set-02	P1	27	NF	1.017	5,5	2,4E+02	<1	<1	4,5E+01	4,2E+03	1 (P)	0	1 (P)	0
		P2	27	NF	53,5	35,4	4,4E+02	<1	1,0E+00	1,4E+02	1,6E+04	0	0	0	0
		P3	27	NF	54,3	35,9	9,0E+02	1,6E+03	3,0E+00	1,8E+02	1,3E+04	0	0	0	0
		P4	27	NF	55,9	36,3	2,3E+02	2,0E+02	<1	4,0E+01	1,2E+04	0	0	0	0
		P5	27	NF	43,3	27,3	1,8E+02	0,0E+00	<1	2,8E+01	1,7E+03	0	0	0	0
		P6	27	NF	54	35,8	1,9E+02	0,0E+00	<1	2,4E+01	2,6E+03	0	0	0	0
		Bivalve	*	*	*	*	*		*	7,6E+03	*	0	0	0	0
Itaguaí (RJ)	19-set-02	P1	23	NF	53	NF	8,8E+03	<1	<1	1,7E+02	2,1E+03	0	0	0	0
		P2	23	NF	51,8	31,5	1,2E+02	<1	<1	3,0E+01	2,0E+03	0	0	0	0
		P3	23	NF	54,3	32,1	1,5E+01	<1	<1	3,0E+00	<10	0	0	0	0
		P4	22	NF	53,9	32,6	5,7E+01	<1	<1	3,0E+00	3,5E+03	0	0	0	0
		P5	22	NF	50,6	30,8	4,6E+01	<1	<1	<1	7,7E+03	0	0	0	0
		P6	22	NF	52,1	31,1	6,9E+03	<1	<1	7,0E+01	6,3E+03	0	0	0	0
		Berbigão	*	*	*	*	*	*	*	1,6E+04	*	0	0	0	0
		Mexilhão	*	*	*	*	*	*	*	2,2E+05	*	0	0	0	0

Anexo D – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em regiões portuárias brasileiras.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*;

Local	Data	Ponto	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos								
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	EI (UFC/100mL)	CV (UFC/mL)	CVP (UFC/g)	Vibrio spp.	Vc	Vp	Vv
Paranaguá (PR)	3-fev-03	Ponto 1	34	7	*	*	7,0E+03	1,1E+02	<1	8,5E+02	1,2E+03	0	0	0	0
	14-mar-03		26	7	27,3	16,8	2,0E+04	8,0E+02	<1	9,4E+02	*	0	0	0	0
	4-abr-03		24	7	41,1	26,2	5,6E+03	9,2E+02	4,0E+00	1,5E+01	2,4E+06	2(A)	0	1	0
	3-fev-03	Ponto 2	35	7	*	*	1,7E+04	1,6E+02	<1	2,0E+01	4,3E+02	0	0	0	0
	14-mar-03		19	6	33,3	20,7	2,4E+03	4,6E+01	<1	3,3E+03	3,0E+05	0	0	0	0
	4-abr-03		23	7	41,8	26,7	6,0E+03	3,5E+02	6,0E+00	6,8E+01	2,5E+05	0	0	0	0
	3-fev-03	Ponto 3	35	7	*	*	1,2E+04	6,3E+01	<1	1,1E+03	3,0E+03	0	0	0	0
	14-mar-03		16	6,5	32,6	20	7,2E+03	3,7E+01	<1	3,0E+03	3,5E+05	0	0	0	0
	4-abr-03		24	7,5	42,1	26,9	3,2E+02	1,5E+02	3,0E+00	3,0E+03	2,8E+05	1(P)	0	1	0
	3-fev-03	Ponto 4	35	7	*	*	5,5E+03	8,8E+01	<1	2,8E+02	3,0E+03	0	0	0	0
	14-mar-03		25	7	38,3	24,1	5,1E+03	1,6E+01	<1	6,5E+02	3,0E+05	0	0	0	0
	4-abr-03		24	7	16	26,9	8,6E+02	9,2E+01	3,0E+00	9,5E+01	1,1E+05	3(P)	0	1	0
	3-fev-03	Ponto 5	35	7	*	*	4,8E+02	6,2E+01	<1	1,7E+02	3,0E+03	0	0	0	0
	14-mar-03		25	7	35	22	1,6E+04	2,0E+01	<1	1,1E+03	3,0E+05	0	0	0	0
	4-abr-03		22	7,5	42,6	27,4	4,0E+02	2,8E+01	1,0E+00	2,6E+02	7,1E+04	0	0	0	0
	3-fev-03	Ponto 6	35	7	*	*	8,1E+03	5,2E+02	<1	1,5E+03	3,0E+03	0	0	0	0
	14-mar-03		25	7	36	22,8	2,9E+03	3,7E+02	<1	2,3E+02	3,0E+05	0	0	0	0
	4-abr-03		23	8	42	26,8	1,3E+03	3,2E+02	3,0E+00	3,6E+01	9,1E+05	2(P)	0	2	0
	3-fev-03	Bacucu	*	*	*	*	*	*	*	7,6E+03	*	6	1	2	0
	14-mar-03	Mexilhão	*	*	*	*	*	*	*	4,0E+05	*	0	0	0	0
	4-abr-03		*	*	*	*	*	*	*	3,2E+05	*	0	0	0	0

Anexo E – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em regiões portuárias brasileiras.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*;

Local	Data	Ponto	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos								
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	EI (UFC/100mL)	CV (UFC/mL)	CVP (UFC/g)	Vibrio spp.	Vc	Vp	Vv
Recife (PE)	16-set-02	Ponto 1	28	*	48,8	30,9	8,7E+02	<1	<1	1,6E+02	3,4E+03	0	0	0	0
	10-fev-02		25	7	49,9	32,8	1,7E+03	2,0E+02	<1	4,4E+03	3,4E+04	0	0	0	0
	12-mar-03		27	7,5	49,8	33	8,0E+03	5,9E+01	<1	2,5E+02	1,6E+05	1 (P)	0	1	0
	1-abr-03		27	7,5	21,5	12,9	6,2E+02	*	<1	1,7E+02	5,6E+04	2(A)	0	2	0
	16-set-02	Ponto 2	28	*	45,7	28,4	1,0E+03	<1	<1	8,0E+01	6,0E+03	0	0	0	0
	10-fev-02		23	7	50,2	32,9	5,2E+02	7,2E+01	<1	1,2E+02	3,0E+04	0	0	0	0
	12-mar-03		27	7,5	45,9	29,3	5,2E+03	4,0E+01	<1	4,2E+01	1,6E+03	2(A)/2(P)	0	1(A)/2(P)	0
	1-abr-03		26	7,5	14,14	8,2	2,3E+02	2,4E+01	<1	2,0E+02	3,0E+05	2(A)	0	1	0
	16-set-02	Ponto 3	29	*	42,8	26,2	1,2E+03	<1	<1	7,0E+02	8,5E+03	0	0	0	0
	10-fev-02		25	7	49,7	32,7	2,5E+03	6,5E+01	<1	3,2E+02	<10	0	0	0	0
	12-mar-03		27	7	48,1	31,6	1,2E+04	2,4E+01	<1	1,1E+02	1,7E+03	1(P)	0	1	0
	1-abr-03		26	7,5	52,7	34,9	7,9E+02	1,7E+01	<1	4,7E+02	1,1E+05	4(A)	0	4	0
	16-set-02	Ponto 4	29	*	44,7	27,9	3,1E+03	<1	<1	2,1E+02	6,2E+03	0	0	0	0
	10-fev-02		24	7	48,4	31,7	1,4E+02	1,9E+01	<1	9,2E+02	<10	1 (A)	0	0	0
	12-mar-03		27	7	49,8	32,7	4,6E+03	1,2E+02	<1	1,1E+02	5,2E+03	1(A)	0	0	0
	1-abr-03		26	7,5	51,5	33,9	3,2E+02	1,7E+02	<1	5,9E+02	1,8E+04	0	0	0	0
	16-set-02	Ponto 5	29	*	42,1	26,2	2,5E+03	<1	<1	3,0E+02	2,7E+04	0	0	0	0
	10-fev-02		25	7	51,8	34,4	3,1E+02	1,4E+01	<1	1,9E+02	4,4E+03	0	0	0	0
	12-mar-03		26	7,5	50,4	32,8	8,9E+03	3,1E+01	<1	2,7E+03	1,7E+04	1(P)	0	1	0
	1-abr-03		26	7,5	52,1	34,4	3,5E+02	1,4E+01	<1	6,8E+01	2,1E+04	2(A)	0	2	0
	16-set-02	Ponto 6	28	*	52,3	33,2	4,3E+02	<1	<1	3,6E+01	9,2E+03	0	0	0	0
	10-fev-02		25	7	52,1	34,5	9,1E+02	2,0E+01	<1	1,2E+02	1,0E+01	1 (A)	0	0	0
	12-mar-03		26	7	50,3	32,6	8,5E+03	2,6E+01	<1	1,1E+02	6,7E+03	1	0	0	0
	1-abr-03		26	7,5	51,4	33,9	6,0E+02	2,6E+01	<1	6,8E+02	1,9E+04	0	0	0	0
	16-set-02	Unha de velho	*	*	*	*	*	*	*	1,4E+05	*	0	0	0	0
	16-set-02	Sururu	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	0	0	0
	16-set-02	Ostra	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	0	0	0
	10-fev-02		*	*	*	*	*	*	*	1,5E+04	*	1	0	0	0
	12-mar-03		*	*	*	*	*	*	*	1,5E+04	*	1	0	0	0
	1-abr-03		*	*	*	*	*	*	*	2,9E+04	*	0	0	0	0

Anexo F – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em regiões portuárias brasileiras.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*;

Local	Data	Ponto	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos								
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	EI (UFC/100mL)	CV (UFC/mL)	CVP (UFC/g)	<i>Vibrio</i> spp.	Vc	Vp	Vv
Rio Grande (RS)	4-out-02	P1	20	5,5	107,1	0,1	1,3E+03	1,5E+02	3,6E+01	1,3E+02	6,7E+04	0	0	0	0
		P2	20	5,5	79,6	0	4,3E+02	3,0E+01	2,8E+01	1,3E+02	5,8E+03	0	0	0	0
		P3	20	6	79,4	0	1,3E+03	7,4E+01	2,2E+01	2,9E+02	5,9E+03	0	0	0	0
		P4	20	5,5	124,6	0,1	6,5E+02	1,4E+01	3,0E+01	1,5E+02	3,2E+03	0	0	0	0
		P5	20	5,5	78,2	0	4,1E+02	6,0E+00	5,0E+01	1,3E+02	2,3E+04	0	0	0	0
		P6	21	6	145,3	0,1	3,1E+02	<1	<1	5,8E+01	1,5E+05	0	0	0	0
		Ostra	*	*	*	*	*	*	*	2,9E+04	*	0	0	0	0

Anexo G – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em regiões portuárias brasileiras.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*;

Local	Data	P	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos								
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	EI (UFC/100mL)	CV (UFC/mL)	CVP (UFC/g)	<i>Vibrio</i> spp.	Vc	Vp	Vv
Santos (SP)	1-out-02	P1	22	7	47,2	29,7	2,0E+04	1,2E+01	2,4E+01	4,3E+01	2,7E+05	0	0	0	0
	6-fev-03		27	8	42,2	29,3	9,4E+03	5,1E+01	<1	1,4E+02	7,7E+03	1(P)	0	0	0
	13-mar-03		24	7	50,1	32,5	1,1E+02	3,2E+01	<1	3,8E+02	5,1E+04	1	0	1	0
	3-abr-03		23	8,5	48,1	31,5	5,7E+02	4,0E+00	<1	2,0E+02	3,0E+05	0	0	0	0
	1-out-02	P2	22	7	43,5	27,6	4,4E+03	2,0E+00	<1	2,0E+01	1,8E+03	0	0	0	0
	6-fev-03		27	7,5	47,6	31,2	1,8E+03	<1	<1	9,5E+01	2,5E+04	0	0	0	0
	13-mar-03		24	7,5	47,4	30,8	4,8E+02	4,0E+02	<1	9,8E+02	7,8E+03	0	0	0	0
	3-abr-03		23	8	49	31,7	5,0E+02	2,0E+00	<1	1,1E+02	4,2E+03	1	0	1	0
	1-out-02	P3	21,5	7	46,1	29,3	6,8E+03	1,8E+01	2,0E+00	2,0E+02	2,0E+02	0	0	0	0
	6-fev-03		26	8	47,3	30,8	1,3E+03	9,0E+00	<1	2,2E+02	8,5E+03	0	0	0	0
	13-mar-03		24	7	35,3	22,2	9,9E+01	2,0E+02	<1	8,7E+02	1,3E+05	2	0	1	0
	3-abr-03		22	7,5	49,1	31,8	1,5E+03	6,0E+00	<1	5,5E+02	4,3E+03	0	0	0	0
	1-out-02	P4	21	7	44,6	28,3	5,6E+04	3,1E+02	5,6E+01	1,2E+02	7,4E+02	0	0	0	0
	6-fev-03		25	7	45,3	29,2	7,7E+02	1,4E+02	<1	1,5E+02	3,0E+03	0	0	0	0
	13-mar-03		25	7	27	16,4	3,6E+02	4,0E+01	<1	5,9E+02	1,3E+06	0	0	0	0
	3-abr-03		24	7,5	45,6	29,2	6,8E+02	2,4E+02	<1	1,8E+02	3,0E+04	1(A)/1(P)	0	2	0
	1-out-02	P5	*	7	42,7	27,1	4,6E+03	6,2E+01	1,0E+01	<1	1,3E+03	0	0	0	0
	6-fev-03		26	6,5	42,7	27,5	3,0E+02	1,2E+02	<1	1,4E+02	2,7E+04	0	0	0	0
	13-mar-03		23	7	26,5	16,1	2,4E+02	4,1E+02	<1	9,0E+02	2,4E+05	0	0	0	0
	3-abr-03		23	7,5	45	29,2	4,5E+02	3,5E+01	<1	6,0E+02	5,1E+03	0	0	0	0
	1-out-02	P6	22	7	40,3	25,3	3,0E+03	4,0E+01	2,0E+01	1,2E+02	9,3E+03	0	0	0	0
	6-fev-03		26	7	41,3	26,6	3,5E+02	9,0E+01	<1	3,6E+02	1,6E+04	1(P)	0	1	0
	13-mar-03		23	7	18,3	10,8	8,8E+01	2,0E+02	<1	1,1E+03	3,0E+05	0	0	0	0
	3-abr-03		21	7,5	40,9	25,6	1,2E+02	1,2E+02	<1	2,7E+02	3,0E+04	0	0	0	0
	1-out-02	Mexilhão	*	*	*	*	*	*	*	1,7E+03	*	0	0	0	0
	6-fev-03		*	*	*	*	*	*	*	1,6E+05	*	2	0	1	0
	13-mar-03		*	*	*	*	*	*	*	3,2E+04	*	0	0	0	0
	3-abr-03		*	*	*	*	*	*	*	1,3E+04	*	0	0	0	0
	1-out-02	Berbigão	*	*	*	*	*	*	*	1,5E+05	*	0	0	0	0
	6-fev-03		*	*	*	*	*	*	*	7,8E+04	*	3	0	3	0
	3-abr-03		*	*	*	*	*	*	*	7,2E+02	*	0	0	0	0
	13-mar-03	Sururu	*	*	*	*	*	*	*	4,4E+04	*	0	0	0	0

Anexo H – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em regiões portuárias brasileiras.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*.

Local	Data	Amostra	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos										
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/ 100mL)	CP (UFC/ 100 mL)	CFE (UFP/ 100mL)	EI (UFC/ 100mL)	CV (UFC/ mL)	CVP (UFC/ g)	Vibrio spp.	Vc	Vp	Vv
Fortaleza (CE)	27-nov-01	LP 670 amostra 62	27	7	59,7	37,2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	23-jan-02	LP 52 amostra 78	30	7,5	50,8	32,7	1,5E+02	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	23-jan-02	LP 53 amostra 79	28	7	16,7	9,7	2,0E+00	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	6-mar-02	LP 165 amostra 99	29	7	46	28,7	2,1E+01	<1	<1	8,0E+00	<1	<1	<10	0	0	0	0
	13-set-02	LP 531 amostra 103	25	7	44,4	28,7	1,3E+03	<1	*	*	<1	3,0E+02	5,1E+03	0	0	0	0
Itaguaí (RJ)	21-nov-01	LP 407 amostra 49	29	7	55,9	35,8	1,4E+02	<1	<1	<1	<1	6,0E+00	<10	0	0	0	0
	21-nov-01	LP 410 amostra 55	27	7	54,6	35,8	1,2E+02	<1	<1	<1	<1	1,0E+00	<10	0	0	0	0
	28-nov-01	LP 1333 amostra 71	22	6	40	25,1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	28-nov-01	LP 1334 amostra 72	24	7	40,8	24,8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1,0E+02	0	0	0	0
	6-fev-02	LP 233 amostra 89	25	7	53,2	34,5	1,8E+02	<1	<1	1,3E+01	<1	3,0E+00	<10	0	0	0	0
	5-mar-02	LP 406 amostra 98	26	7	52,5	34,5	1,1E+03	<1	<1	3,0E+01	<1	3,0E+00	<10	0	0	0	0
	19-set-02	amostra 105	*	*	56,8	34,3	1,3E+02	<1	*	*	<1	<1	<10	0	0	0	0

Anexo I – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em tanques de lastro de navios.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; CP= *Clostridium perfringens*; CFE= Colifagos F-específicos; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presuntivos da família Vibrionaceae; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*.

Local	Data	Amostra	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos										
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	CP (UFC/100 mL)	CFE (UFP/100mL)	EF (UFC/100mL)	CV (UFC/mL)	CVP (UFC/g)	Vibrio spp.	Vc	Vp	Vv
Belém (PA)	31-out-01	LP 455 amostra 16	28	7	39,5	23,8	<1	<1	6,0E+00	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	5-nov-01	LP 457 amostra 25	30	7	8,9	4,8	1,0E+00	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	6-nov-01	LP 462/01 amostra 27	30	6	6	3,2	2,0E+02	1,0E+00	<1	<1	<1	2,4E+02	9,4E+02	16(A)/6 (P)	3 (A)	1(A)/2 (P)	0
	26-nov-01	LP 496 amostra 58	35	7	55,7	34,9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	28-jan-02	LP 42 amostra 80	32	7	47,9	29,8	5,1E+01	<1	<1	<1	1,4E+01	<1	<10	0	0	0	0
	29-jan-02	LP 45 amostra 81	30	6,5	6,5	3,4	1,4E+02	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	31-jan-02	LP 046 amostra 84	30	7	5,7	1,9	1,5E+02	<1	<1	5,0E+00	<1	<1	<10	0	0	0	0
	6-mar-02	LP 092 amostra 100	29	7	54,6	34,9	1,4E+01	<1	<1	1,3E+01	<1	<1	<10	0	0	0	0
	10-set-02	LP 392 amostra 102	30	7	13,6	7,7	7,6E+01	4,0E+00	*	*	<1	1,6E+02	9,5E+02	0	0	0	0
Salvador (BA)	31-out-01	LP 1639 amostra 18	27	7	52,8	32,7	4,8E+01	<1	<1	<1	<1	3,3E+01	1,0E+01	0	0	0	0
	7-nov-01	LP 1701 amostra 28	26	7	46,8	29,1	<1	<1	8,0E+02	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	20-nov-01	LP 1826 amostra 46	28	7	59,3	36,9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	21-nov-01	LP 1843 amostra 51	28	6,5	38,5	23,8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	28-nov-01	LP 1845	29	7	48,4	30,1	5,5E+02	<1	<1	<1	6,0E+00	<1	<10	0	0	0	0
	30-jan-02	LP 0158 amostra 75	29	7	57	35,1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	18-mar-02	LP 458 amostra 101	29	7	44,4	28,4	4,6E+01	<1	<1	*	<1	2,0E+00	<10	0	0	0	0

Anexo J – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em tanques de lastro de navios.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; CP= *Clostridium perfringens*; CFE= Colifagos F-específicos; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presuntivos da família Vibrionaceae; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*.

Local	Data	Amostra	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos										
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	CP (UFC/100 mL)	CFE (UFP/100mL)	EI (UFC/100mL)	CV (UFC/mL)	CVP (UFC/ g)	Vibrio spp.	Vc	Vp	Vv
Recife (PE)	24-out-01	LP 247/01 amostra 9	31	7,5	29,2	17,7	<1	<1	<1	<1	<1	1,3E+01	2,0E+02	0	0	0	0
	31-out-01	LP 438 amostra 17	27	7,5	57,7	36,1	6,7E+02	<1	<1	<1	<1	5,0E+00	<10	0	0	0	0
	20-nov-01	LP 462 amostra 47	28	7	53,4	34,7	<1	<1	2,0E+00	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	22-nov-01	LP 275/01 amostra 57	30	8	50,9	32,9	1,1E+02	2,0E+00	<1	<1	5,0E+00	2,3E+01	8,2E+02	0	0	0	0
	26-nov-01	LP 280 amostra 61	31	6	33,3	20,3	2,9E+03	<1	<1	<1	2,0E+00	<1	<10	0	0	0	0
	27-nov-01	LP 475 amostra 63	28,5	7	58	37	1,1E+01	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	28-nov-01	LP 281 amostra 76	29	7,5	55,2	36	<1	3,3E+01	2,7E+01	<1	1,0E+01	<1	<10	0	0	0	0
	6-fev-02	LP 42 amostra 88	32	7	56,1	36,9	<1	<1	<1	1,1E+01	<1	<1	<10	0	0	0	0
	16-set-02	amostra 104	28	7,5	53,8	35,4	2,1E+02	<1	*	*	2,0E+00	4,0E+02	2,7E+03	0	0	0	0
Rio Grande (RS)	25-out-01	LP 1080 amostra 11	20	7,5	57,7	36,5	8,8E+01	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	29-out-01	LP 1089 amostra 13	22,5	8	45,7	28,6	1,3E+03	3,8E+01	1,0E+01	<1	<1	4,5E+01	4,0E+01	3	0	0	0
	31-out-01	LP 286 amostra 19	19	8	54,2	33,4	4,0E+01	<1	<1	<1	<1	8,4E+01	<10	0	0	0	0
	8-nov-01	LP 1119 amostra 32	20,5	6	49,3	30,5	<1	<1	<1	1,6E+02	<1	<1	<10	0	0	0	0
	13-nov-01	LP 1131 amostra 36	19	7	52,9	33,9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	20-nov-01	LP 1161 amostra 42	23,5	8	57,7	36,6	2,0E+00	<1	<1	*	5,0E+03	<1	<10	0	0	0	0
	28-nov-01	LP 1185 amostra 68	21	6	52,2	32,2	2,0E+02	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	28-nov-01	LP 1182 amostra 69	21	7	44,6	27,4	2,4E+03	4,6E+01	3,0E+01	<1	2,0E+01	8,6E+01	4,6E+02	0	0	0	0
	18-fev-02	LP 166 amostra 90	23	7	52,8	33,8	<1	<1	<1	3,3E+01	<1	<1	<10	0	0	0	0
	8-out-02	amostra 107	21	6,5	470	0,2	1,3E+03	<1	*	*	5,0E+01	<1	<10	0	0	0	0

Anexo L – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em tanques de lastro de navios.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; CP= *Clostridium perfringens*; CFE= Colifagos F-específicos; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*.

Local	Data	Amostra	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos										
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	CP (UFC/100 mL)	CFE (UFP/100mL)	EF (UFC/100mL)	CV (UFC/mL)	CVP (UFC/g)	Vibrio spp.	Vc	Vp	Vv
Paranaguá (PR)	17-out-01	LP 1348 amostra 3	24	7	52,4	33,5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	24-out-01	LP 1329/01 amostra 7	26	7	54,9	34,2	2,3E+02	<1	<1	<1	<1	3,3E+02	<10	1	0	0	0
	5-nov-01	LP 1472 amostra 24	22,5	7	55	35,9	1,1E+02	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	6-nov-01	LP 1427 amostra 26	24	6	58,8	36,3	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	7-nov-01	LP 1441 amostra 29	27	7	54,7	35,6	1,3E+02	<1	6,0E+01	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	7-nov-01	LP 1447 amostra 30	26	7,5	54,2	34,9	1,5E+03	<1	<1	5,0E+01	<1	<1	<10	0	0	0	0
	13-nov-01	LP 1508 amostra 35	26	7	61,9	39,5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	2,1E+03	0	0	0	0
	19-nov-01	LP 1544 amostra 40	25	7	47,7	30,1	4,0E+01	3,0E+00	<1	<1	<1	5,0E+00	3,0E+01	0	0	0	0
	20-nov-01	LP 1562 amostra 45	24	7,5	8,73	4,6	<1	<1	<1	2,0E+01	<1	<1	<10	0	0	0	0
	21-nov-01	LP 1540 amostra 50	25	7	55,2	35,1	1,2E+02	<1	<1	<1	4,0E+01	4,0E+00	<10	0	0	0	0
	21-nov-01	LP 1580 amostra 52	24	7	56,9	36,8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	26-nov-01	LP 1493/01 amostra 59	27	7	51,7	31,6	4,8E+03	<1	6,2E+01	<1	5,0E+01	3,3E+01	1,9E+03	0	0	0	0
	26-nov-01	LP 1605 amostra 60	26	6,5	42,4	26,5	3,6E+03	<1	<1	<1	2,0E+01	<1	<10	0	0	0	0
	27-nov-01	LP 1491 amostra 64	26	7	56	35,9	4,0E+02	<1	<1	<1	5,0E+01	<1	<10	0	0	0	0
	28-nov-01	LP 1507 amostra 70	25	7	55,5	36,8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4,0E+01	0	0	0	0
	28-nov-01	LP 1607/01 amostra 73	26	7	50	32,5	5,4E+03	5,0E+01	6,0E+01	<1	9,0E+01	6,7E+01	5,0E+01	2	0	1	0
	29-nov-01	LP 1609 amostra 74	26	7	52,7	33,8	2,4E+03	3,1E+02	3,0E+02	<1	1,6E+01	<1	<10	0	0	0	0
	21-fev-02	LP 194 amostra 94	25	7	57,2	37,8	8,0E+02	<1	<1	4,0E+01	9,4E+01	<1	<10	0	0	0	0

Anexo M– Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em tanques de lastro de navios.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; CP= *Clostridium perfringens*; CFE= Colifagos F-específicos; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*.

Local	Data	Amostra	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos										
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/ 100mL)	CP (UFC/ 100 mL)	CFE (UFP/ 100mL)	EF (UFC/ 100mL)	CV (UFC/ mL)	CVP (UFC/ g)	Vibrio spp.	Vc	Vp	Vv
Santos (SP)	16-out-01	LP 3025 amostra 1	23,5	7	51, 5	32,8	4,2E+03	<1	<1	4,0E+00	<1	1,1E+02	<10	0	0	0	0
	16-out-01	LP 3027 amostra 2	24	7	47,2	30	2,0E+00	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	22-out-01	LP 216/01 amostra 4	20	7	54	35,1	1,3E+03	2,0E+02	<1	<1	<1	4,3E+02	8,5E+02	0	0	0	0
	22-out-01	LP 217 amostra 5	25	7	48,9	31,5	2,6E+02	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	24-out-01	LP 214 amostra 8	20	7	58,1	33,8	7,8E+02	<1	<1	<1	<1	1,0E+02	2,0E+02	8	0	0	0
	29-out-01	LP 222 amostra 12	24	7	53,4	34	9,1E+01	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	5-nov-01	LP 231 amostra 20	22	7	55,2	35,8	1,9E+02	<1	<1	<1	<1	6,8E+01	1,0E+01	5	0	1	0
	5-nov-01	LP 233 amostra 21	28	6,5	56,5	36,6	4,6E+01	<1	2,0E+00	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	5-nov-01	LP 234 amostra 22	22	6,5	57,6	35,9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	8-nov-01	LP 236 amostra 31	21	7	54	34	1,0E+02	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	12-nov-01	LP 239 amostra 33	22	6	9,96	5,5	2,4E+02	1,1E+01	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	19-nov-01	LP 3464 amostra 38	23	7	44,2	27,2	1,0E+02	<1	<1	3,0E+00	<1	1,0E+00	<10	0	0	0	0
	19-nov-01	LP 3481 amostra 39	28	6,5	54,7	34,9	1,2E+01	<1	<1	5,0E+00	<1	<1	<10	0	0	0	0
	20-nov-01	LP 243 amostra 43	25	6,5	55,8	35,1	<1	<1	<1	6,1E+01	<1	<1	<10	0	0	0	0
	20-nov-01	LP 3436 amostra 44	25	7,5	56,3	35,5	<1	<1	2,0E+00	2,0E+00	<1	<1	<10	0	0	0	0
	21-nov-01	LP 247 amostra 53	25	6,5	56,7	35,6	2,3E+02	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	21-nov-01	LP 248 amostra 54	*	6	56,2	35,9	1,6E+02	<1	<1	<1	<1	3,0E+00	<10	0	0	0	0
	28-nov-01	LP 3522 amostra 66	25	6	42,4	25,8	9,2E+01	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	28-nov-01	LP 3600 amostra 67	25	7	52	35,6	3,4E+03	<1	1,1E+01	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	4-fev-02	LP 304 amostra 86	29	7	55,7	35,3	1,3E+01	<1	<1	1,5E+01	<1	<1	<10	0	0	0	0
	6-fev-02	LP 125 amostra 87	27	7	53	33,6	4,2E+01	<1	<1	2,0E+00	<1	<1	<10	0	0	0	0
	20-fev-02	LP 428 amostra 91	27	6,5	53,2	34	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	20-fev-02	LP 448 amostra 92	27	6	53,4	34,5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	1-out-02	Amostra 106	22	7	51	33,1	3,2E+02	<1	*	*	<1	<1	<10	0	0	0	0

Anexo N – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em tanques de lastro de navios.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; CP= *Clostridium perfringens*; CFE= Colifagos F-específicos; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presumitivos da família *Vibrionaceae*; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*; Vv= *V. vulnificus*.

Local	Data	Amostra	Parâmetros Físico-químicos				Parâmetros Microbiológicos										
			Temp. (°C)	pH	Cond. (ms)	Salin. ‰	BVM (UFC/mL)	CT (UFC/100mL)	CP (UFC/100 mL)	CFE (UFP/100mL)	EF (UFC/100mL)	CV (UFC/mL)	CVP (UFC/ g)	Vibrio spp.	Vc	Vp	Vv
Vitória (ES)	22-out-01	LP 01/0686 amostra 6	20	7	56,2	34,4	5,1E+02	<1	<1	<1	*	1,1E+02	<10	0	0	0	0
	24-out-01	LP 0692 amostra 10	22	7	54,5	34,6	6,4E+01	<1	<1	<1	*	<1	<10	0	0	0	0
	29-out-01	LP 0703 amostra 14	23	7	52,1	31,7	1,4E+01	<1	<1	<1	*	<1	<10	0	0	0	0
	12-nov-01	LP 1001 amostra 34	27	7	57	36,5	2,0E+00	<1	<1	1,5E+01	*	*	<10	0	0	0	0
	13-nov-01	LP 1037 amostra 37	22	7	54,6	33,5	<1	<1	<1	<1	*	<1	<10	0	0	0	0
	19-nov-01	LP 1053 amostra 41	22,5	7	54,7	35,5	<1	<1	<1	5,0E+01	*	<1	<10	0	0	0	0
	20-nov-01	LP 1060 amostra 48	23	7	51	32,8	<1	<1	<1	*	*	<1	1,0E+01	0	0	0	0
	22-nov-01	LP 0754 amostra 56	22	7,5	54,7	35,2	6,9E+01	<1	<1	<1	*	1,0E+00	<10	0	0	0	0
	27-nov-01	LP 1083 amostra 65	27	6,5	53,2	33,2	1,0E+00	<1	<1	<1	*	<1	<10	0	0	0	0
	23-jan-02	LP 0040 amostra 77	28	7	54,9	35,8	7,5E+01	<1	<1	<1	*	<1	<10	0	0	0	0
	30-jan-02	LP 071 amostra 83	25	7	34,1	21,1	3,2E+01	<1	<1	<1	<1	<1	<10	0	0	0	0
	31-jan-02	LP 3464 amostra 85	32	7	35,2	21,9	7,9E+01	<1	<1	1,0E+01	5,0E+00	<1	<10	0	0	0	0
	20-fev-02	LP 108 amostra 93	26	7	31,6	19,5	3,3E+03	<1	<1	6,0E+01	<1	<1	<10	0	0	0	0
	22-fev-02	LP 090 amostra 95	27	7	47,9	30,1	1,1E+03	<1	<1	<1	4,0E+01	<1	<10	0	0	0	0
	4-mar-02	LP 173 amostra 96	30	7	54	35,4	6,7E+01	<1	<1	7,0E+01	6,5E+01	7,3E+01	<10	0	0	0	0
	5-mar-02	LP 172 amostra 97	31	7	51,7	34	4,6E+01	<1	<1	3,7E+01	7,1E+01	4,0E+00	<10	0	0	0	0

Anexo O – Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos obtidos em amostras coletadas em tanques de lastro de navios.

Legenda – BV = Bactérias Viáveis Marinhas; CT= Coliformes termotolerantes; CP= *Clostridium perfringens*; CFE= Colifagos F-específicos; EI= Enterococos intestinais; CV= Contagem de membros presuntivos da família *Vibrionaceae*; UFC= Unidade Formadora de Colônia; P= Plâncton; Vc= *Vibrio cholerae*; Vp= *V. parahaemolyticus*, Vv= *V. vulnificus*.

Anexo P – Meios utilizados para triagem bioquímica recomendados pelo BAM/FDA (1995):
 (a) TSI (Triple Sugar Iron) sem inoculação; (b) TSI com PAC/SAC; TSI com PAC/SAL; (d) AGS (Arginine Glucose Slant) sem inoculação; (e) AGS com PAC/SAL; (f) T₁N₀ (Tryptone NaCl 0%) ou T₁N₃ (Tryptone NaCl 3%) sem inoculação; (g) T₁N₀ ou T₁N₃ com inoculação; (h e i) OF Glicose sem e com inoculação.