

EDITH MARIELA BURBANO ROSERO

**FREQÜÊNCIA E DIVERSIDADE DE COLIFAGOS SOMÁTICOS
ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR, PLÂNCTON E
BIVALVES DA BAIXADA SANTISTA, CANAL DE
SÃO SEBASTIÃO E UBATUBA**

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

**São Paulo
2009**

EDITH MARIELA BURBANO ROSERO

**FREQÜÊNCIA E DIVERSIDADE DE COLIFAGOS SOMÁTICOS
ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR, PLÂNCTON E
BIVALVES DA BAIXADA SANTISTA, CANAL DE SÃO SEBASTIÃO E
UBATUBA**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera

**São Paulo
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Burbano-Rosero, Edith Mariela.

Freqüência e diversidade de colifagos somáticos isolados de amostras de água do mar, plâncton e bivalves da Baixada Santista, canal de São Sebastião e Ubatuba / Edith Mariela Burbano Rosero. - São Paulo, 2009.

Orientador: Irma Nelly Gutierrez Rivera.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Ecologia microbiana molecular.

Versão do título para o inglês: Frequency and diversity of somatic coliphages isolated from seawater, plankton and bivalves samples from baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba.

Descritores: 1. Colifagos somáticos 2. Diversidade 3. Ecossistema marinho 4. Água do mar 5. Plâncton 6. Região costeira de São Paulo I. Rivera, Irma Nelly Gutierrez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB073/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Edith Mariela Burbano Rosero.

Título da Tese: Freqüência e diversidade de colifagos somáticos isolados de amostras de água do mar, plâncton e bivalves da Baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba.

Orientador(a): Irma Nelly Gutierrez Rivera.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus amados pais, pelo verdadeiro apoio, paciência e preciosos conselhos....Eu amo vocês. Obrigada por acredita em mim!.

A meu marido por sua compreensão, incentivo e amor incondicional.

A minha família por serem sempre meu maior exemplo de dignidade.

A meus amigos por valorizar minha amizade e carinho.

A Deus, plasmado em cada uma das experiências de amor e verdade.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho, em particular:

À **Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera**, minha orientadora, pela orientação, confiança, dedicação e disponibilidade manifestada durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao **CNPq e CAPES** (a través do programa PAE), pelas bolsas concedidas durante a pós-graduação.

Ào **Dr. Tomomasa Yano**, pela oportunidade de conhecer alguém com mente brilhante e espírito nobre.

À **Dra. Marli Ueda-Ito**, pela oportunidade que me proporcionou de realizar a técnica de microscopia eletrônica no seu laboratório, pelo ensinamento, a orientação, amizade e apoio incondicional a nível profissional e pessoal.

À **Dra. Keico Nagasse-Sugahara**, pelo apoio dado na revisão dos resumos e artigos. Agradeço sinceramente a contribuição imprescindível e entusiástica na realização dos experimentos de seqüenciamento.

Ao **Dr. Jonas Kisielius**, minha eterna gratidão por aceitar me ensinar as técnicas de microscopia eletrônica e contribuir decisivamente com a qualidade da mesma.

Ao **Dr. Benny Spyra**, pelos comentários extremamente úteis e importantes para o andamento deste trabalho.

À **Dra. Dolores Menhert**, que me proveu e auxiliou nas etapas mais difíceis do trabalho.

Ao **Dr. Gabriel Padilla**, por me permitir compartilhar de seu ilimitado conhecimento, pelas sugestões dadas durante o desenvolvimento das fases de indução de profagos e extração de ácido nucléico.

A **Alice, Naide e Aninha**, pelo carinho, amizade, ajuda e colaboração durante todas as etapas de meus estudos de doutorado.

A **Zelma Fernandez Marinho**, pelo exemplo de cordialidade e justiça em todos os seus atos.

A **Rosa Gamba**, pelos auxílios no laboratório e pela cooperação nas diferentes etapas do trabalho.

Ao **Seu Luis**, pela ajuda, afeto e companheirismo. O senhor tem um coração muito nobre.... Muito obrigada por ser um exemplo de vida e humanidade.

A **Adriana Paisano**, pela amizade sincera e apoio incondicional durante cada uma das fases deste projeto.

A **Maria do Carmo**, pela força, amizade, carinho, apoio e caronas dadas durante a maior parte do doutorado.

A **Dra. Nilce Pedro e Pombo**, pelos conselhos e sua disponibilidade para me escutar.

Aos colegas e verdadeiros amigos do laboratório de Ecologia Microbiana Molecular: **Keili, Mario, Oyama, Solange, Carol, Lilian, Gislaine, Claudiana, Bianca e Franklin** pelo ótimo convívio, pelo auxílio moral e pessoal.

Às estagiárias do laboratório: **Renata, Neilza, Milena, Bruna, Helena, Daniel**, pelo carinho, amizade, momentos de alegria e diálogos filosóficos.

Ao pessoal da **Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas**, pelo importante auxílio na revisão das normas de redação e apresentação desta tese.

Ao **German**, por tudo o que representa para mim, minha fantasia infinita, todo companheirismo, todo apoio e amor incondicional, todo perdão, paciência e encanto. Obrigada amor, pelos conselhos, críticas e sugestões. Sem você eu não teria conseguido!.

A meus irmãos **Nidia, Charito, Carlos Alberto, Betty** por dividirem comigo as alegrias e tristezas que a vida nos reservou.

Aos meus sobrinhos **Lorena, Mario Fernando, Deisy, Erica Paola, Carlos Daniel, Laura Sofia, William David** que, apesar de revolucionar minha vida, sempre me estimularam, apoiaram e orgulharam-se de mim.

Não podia deixar de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida, **Ricardo Alberto, Isabel Alejandrina**, as quais foram os maiores motivos para eu seguir sempre em frente e nunca desistir de nada nessa vida, a pesar de todas as dificuldades encontradas no percurso.

Agradeço também a todos os amigos que eu fiz neste país, desde a Universidade até minhas aulas de pilates. Obrigada por me ensinar as costumes do Brasil, país maravilhoso de gente boa, amável e alegre.

Este trabalho só foi possível devido ao auxílio de inúmeras pessoas do Instituto de Ciências Biomédicas e do Instituto Adolfo Lutz. Listá-los não caberia neste trabalho. Sou grata a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa. Muito obrigada mesmo!

"A gratidão desbloqueia a abundância da vida. Ela torna o que temos em suficiente, e mais. Ela torna a negação em aceitação, caos em ordem, confusão em claridade. Ela pode transformar uma refeição em um banquete, uma casa em um lar, um estranho em um amigo. A gratidão dá sentido ao nosso passado, traz paz para o hoje, e cria uma visão para o amanhã."

Melody Beattie

"Não, o sucesso não se deseja a ninguém. Acontece a alguém o mesmo que aos alpinistas, que se matam para chegar ao cume e quando chegam, que fazem? Descer, ou tratar de descer discretamente, com a maior dignidade possível."

Gabriel García Márquez

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA – “American Public Health Association”
BOX- “BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic”
CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CFSAN – “Center for Food Safety and Applied Nutrition”
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CS – Colifagos somáticos
CT – Coliformes termotolerantes
EPA – “Environmental Protection Agency”
ERIC - “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”
FAO - “Food and Agriculture Organization”
FDA – “Federal and Drug Administration”
FUNDESPA – Fundação de Estudos e Pesquisas Aquáticas
g - grama
h - hora(s)
m² - metro quadrado(s)
mL - mililitro
ng - nanograma
µg – micrograma
nm – nanometro (s)
°C - grau centígrado (s)
REP- “Repetitive Extragenic Palindromic”
SEADE – Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados
seg – segundo (s)
UFC- Unidades Formadoras de Colônias
UFP- Unidades Formadoras de Placas
USEPA – “United States Environmental Protection Agency”
WHO - “World Health Organization”

RESUMO

BURBANO-ROSETO, E. M. **Frequência e diversidade de colifagos somáticos isolados de amostras de água do mar, plâncton e bivalves da Baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba.** 2009. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os colifagos somáticos (CS) foram reportados como os melhores indicadores de poluição fecal da qualidade microbiológica do ecossistema marinho. Entretanto, apesar dos fagos com cauda serem os mais abundantes pouco se sabe sobre a sua diversidade. Neste trabalho, foi determinada a abundância de colifagos somáticos em amostras de água do mar (73), plâncton (46) e bivalves (11) coletadas em três ecossistemas costeiros do estado de São Paulo: Santos, São Sebastião e Ubatuba. Foram encontradas correlações entre a contagem de colifagos somáticos (CS) e as bactérias marinhas viáveis ($p=0,0001$), os coliformes termotolerantes ($p=0,0001$) e *E.coli* ($p=0,0001$) e uma correlação fraca entre CS e enterococos intestinais ($r=0,247$, $p=0,035$). Com relação aos parâmetros físico-químicos foi observada uma correlação negativa com a temperatura ($p=0,004$). Em Ubatuba, as amostras de água do mar não apresentaram colifagos somáticos. Porém, houve baixas concentrações em amostras de plâncton (<1 a 10 UFP/g), e bivalves (<1 a 14 UFP/g). Em São Sebastião, nas amostras de água do mar as contagens oscilaram entre <1 a 15 UFP/100 mL, em plâncton de <1 a $4,2 \times 10^2$ UFP/g e em bivalves de <1 a 2 UFP/g. Em Santos, foram obtidas as maiores contagens de colifagos, em água do mar (<1 a $3,4 \times 10^3$ UFP/100 mL) em comparação com as amostras de plâncton (<1 a $4,7 \times 10^2$ UFP/g) e bivalves (<1 a $2,2 \times 10^1$ UFP/g). Nos três ecossistemas foram observados quatro morfotipos: A1 (3%), B1 (63%), C1 (21%) e D1 (13%). As frequências das famílias encontradas nas amostras de água do mar e plâncton foram: *Siphoviridae* (50% e 65,8%), *Podoviridae* (36% e 15,8%), *Microviridae* (9% e 15,8%) e *Myoviridae* (5%, 2,6%), respectivamente. Em bivalves, a família observada foi *Siphoviridae*. Em todos os casos, *Siphoviridae*, especialmente aqueles com caudas flexíveis e enroladas foram mais abundantes. Os 62 colifagos isolados foram caracterizados genotipicamente pela análise do DNA com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Bgl*II, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hin*fI, *Hae*III e *Rsa*I. Houve eficiência de digestão com as enzimas: *Dra*I (54,8%), *Eco*RI (40,3%), *Eco*RV (19,4%) e *Bgl*II (14,5%). Entre as técnicas rep-PCR empregadas, foi verificado que o BOX-PCR foi a técnica mais eficiente na caracterização molecular dos colifagos isolados. Entretanto, nenhuma das metodologias utilizadas foi discriminatória para agrupar os colifagos de acordo ao tipo de amostra, origem do isolado e família. Assim também foram pesquisados os genes

que codificam para as toxinas CT, TCP, LT e ST e 9,6% dos colifagos continham os genes que codificam para as toxinas termoestável (ST) e/ou termolábil (LT). O presente estudo está identificando os colifagos como “perigos microbiológicos” no ambiente costeiro que podem afetar a saúde humana e animal, e dando subsídios para estudos posteriores na avaliação do risco microbiológico do ecossistema marinho.

Palavras-chave: Colifagos somáticos. Diversidade. Ecossistema marinho. Água do mar. Plâncton. Bivalves. Região costeira de São Paulo.

ABSTRACT

BURBANO-ROSETO, E. M. **Frequency and diversity of somatic coliphages isolated from seawater, plankton and bivalves samples from Baixada Santista, Canal de São Sebastião and Ubatuba**. 2009. 155 p. Ph. D. Thesis (Science) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The somatic coliphages (SC) were indicated as the better indicator for fecal pollution in the microbiological quality of the marine ecosystem. However, in spite of the abundance of tailed coliphages, very little is known about its diversity. In this research, it was obtained the abundance of somatic coliphages in seawater (73), plankton (46) and bivalves (11) samples collected from 3 coastal regions of São Paulo: Santos, São Sebastião and Ubatuba. Somatic coliphages counts were correlated with marine viable bacteria ($p=0.0001$), thermotolerant coliforms ($p=0.0001$), *E. coli* ($p=0.0001$) and intestinal enterococci ($r=0.247$, $p=0.035$). Regarding the physico-chemical parameters, it was found a negative correlation with temperature ($p=0.0004$). In Ubatuba, the seawater samples no showed somatic coliphages. However, there were low concentration in plankton samples (<1 to 10 PFU/g) and bivalves (<1 to 14 PFU/g). In São Sebastião, the counts in seawater samples ranged from <1 to 15 PFU/100 mL, in plankton from <1 to 4.2×10^2 PFU/g and in bivalves from <1 to 2 PFU/g. In seawater samples collected from Santos region were found the highest counts of coliphages (<1 to 3.4×10^3 PFU/100 mL) compared to the plankton (<1 to 4.7×10^2 PFU/g) and bivalves samples (<1 to 22 PFU/g). In all, three regions, four morphotypes were observed: A1 (3%), B1 (63%), C1 (21%) and D1 (13%). The frequency of taxonomic SC families found in seawater and plankton samples were: *Siphoviridae* (50% and 65.8%), *Podoviridae* (36% and 15.8%), *Microviridae* (9% and 15.8%), and *Myoviridae* (5%, 2.6%), respectively. In bivalves, only the family *Siphoviridae* was observed. In all cases, especially those with flexible and curled tails, *Siphoviridae* was more abundant. The sixty two coliphages isolated were DNA and were characterized by RFLP technique using the following restriction enzymes: *Bam*HI, *Bg*III, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hin*fI, *Hae*III and *Rsa*I. Better efficiency of digestion was obtained with: *Dra*I (54.8%), *Eco*RI (40.3%), *Eco*RV (19.4%) and *Bg*III (14.5%). Among the rep-PCR techniques used verified that the BOX-PCR allowed a better molecular characterization. However, none of the methods used was useful to group according to sample type, source of isolation and/or taxonomic classification. It was also investigated the presence of the genes encoding CT, TCP, LT and ST toxins, and 9,6% of coliphages contained genes codifying for thermostable toxin (ST) and/or thermolabil toxin (LT). This study is identifying the coliphages as microbial hazard in the coastal region that could affect the animal and

human health, giving support to later studies for microbial risk assessment of marine ecosystem.

Key words: Somatic coliphages. Diversity. Marine ecosystem. Seawater. Plankton. Bivalves. Coastal region of São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Etapas de um processo de replicação fágico.....	33
Tabela 2	Receptores de alguns bacteriófagos de <i>E. coli</i>	34
Tabela 3	Algumas propriedades dos fagos utilizadas na taxonomia (ICTV).....	39
Tabela 4	Primers e condições de PCR para a detecção de genes associados à virulência em colifagos somáticos.....	71
Tabela 5	Valores mínimos, máximos, medianas, médias aritméticas e desvio padrão das variáveis físico-químicas e microbiológicas nos três ecossistemas estudados.....	81
Tabela 6	Coefficiente de correlação de <i>Spearman</i> entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos determinados nas amostras de água dos três ambientes estudados.....	83
Tabela 7	Freqüências dos parâmetros microbiológicos, colifagos somáticos (CS) e famílias de colifagos por região estudada.....	89
Tabela 8	Famílias, morfotipos, tipos e média aritmética dos tamanhos dos colifagos somáticos isolados a partir de amostras de água do mar de Santos.....	90
Tabela 9	Freqüências de colifagos somáticos e famílias isoladas a partir de amostras de plâncton por área de estudo e ponto de coleta.....	91
Tabela 10	Família, morfotipo, tipo e média aritmética dos tamanhos de colifagos somáticos isolados a partir de amostras de plâncton nas três áreas estudadas, por ponto de coleta.....	94
Tabela 11	Freqüência de colifagos somáticos, famílias, morfotipos, tipos e média aritmética dos tamanhos dos colifagos somáticos isolados a partir de amostras de bivalves por área estudada.....	95
Tabela 12	Freqüência da clivagem do DNA de colifagos somáticos por enzima de restrição e da amplificação do DNA por rep-PCR.....	102
Tabela 13	Perfis de digestão dos DNAs de colifagos pela enzima de restrição <i>EcoRI</i> , segundo família e área estudada.....	104
Tabela 14	Estimativa do tamanho de colifagos somáticos determinado pelo corte a enzima <i>DraI</i> , por família e por fonte de isolamento.....	107
Tabela 15	Similaridade dos colifagos somáticos contendo genes homólogos às toxinas ST e LT de acordo ao seqüenciamento.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Adsorção do fago a uma célula hospedeira e conseqüente penetração por injeção do ácido nucléico.....	34
Figura 2	Tipos de ciclos fágicos.....	35
Figura 3	Representação gráfica de uma curva de <i>one step growth</i> para um fago lítico (T4).....	37
Figura 4	Morfotipos de bacteriófagos.....	38
Figura 5	Classificação dos fagos com base na morfologia e no tipo de ácido nucléico.....	39
Figura 6	Colifago T4.....	40
Figura 7	Colifago λ	41
Figura 8	Colifagos T7.....	42
Figura 9	Fago ϕ X174.....	43
Figura 10	Fago de enterobactérias.....	44
Figura 11	Colifago MS2.....	44
Figura 12	Modelo da transferência genética em <i>Vibrio cholerae</i> . Cepas não patogênicas transformam-se em cepas patogênicas pela infecção de fagos filamentosos.....	48
Figura 13	Componentes genéricos da análise de riscos.....	50
Figura 14	Localização dos pontos de coleta de amostras em Ubatuba, São Sebastião e Santos.....	
Figura 15	Valores dos parâmetros físico-químicos determinados em amostras de água do mar do Canal de São Sebastião.....	74
Figura 16	Valores dos parâmetros físico-químicos determinados em amostras de água do mar da Baixada Santista, por ponto de coleta.....	76
Figura 17	Média aritmética dos parâmetros físico-químicos determinados em amostras de água do mar de Ubatuba.....	
Figura 18	Média aritmética dos parâmetros microbiológicos determinados em amostras de água do mar na área de São Sebastião.....	78
Figura 19	Parâmetros microbiológicos determinados em amostras de água do mar na área de Santos, por ponto de coleta.....	79
Figura 20	Média aritmética dos parâmetros microbiológicos determinados em amostras de água do mar na área de Ubatuba.....	80
Figura 21	Boxplot dos indicadores microbiológicos correlacionados com os colifagos somáticos nos três ecossistemas estudados.....	85
Figura 22	Indução de <i>V.cholerae</i> utilizando luz ultravioleta.....	86
Figura 23	Comportamento das cepas conservadas em glicerol durante um ano de estudo.....	87
Figura 24	Colifagos somáticos na técnica de semeadura em placa.....	88
Figura 25	Freqüência das famílias de colifagos somáticos em amostras de água do mar da Baixada Santista, por ponto de coleta.....	90

Figura 26	Frequência dos morfotipos em amostras de água do mar da Baixada Santista, por ponto de coleta.....	91
Figura 27	Frequência das famílias de colifagos somáticos em amostras de plâncton da Baixada Santista, por ponto de coleta.....	92
Figura 28	Frequência das famílias de colifagos somáticos em amostras de plâncton da área de São Sebastião, por ponto de coleta.....	93
Figura 29	Frequência das famílias de colifagos somáticos em amostras de plâncton da área de Ubatuba, por ponto de coleta.....	93
Figura 30	Frequência dos morfotipos de colifagos somáticos isolados de amostras de plâncton nos três ecossistemas estudados (Santos, São Sebastião e Ubatuba).....	94
Figura 31	Microfotografia eletrônica de colifagos pertencentes à Família <i>Siphoviridae</i> .	96
Figura 32	Microfotografia eletrônica de colifagos pertencentes à Família <i>Podoviridae</i> .	97
Figura 33	Microfotografia eletrônica de colifagos pertencentes à Família <i>Myoviridae</i> (tipo YerA41) isolados de amostras de Santos.....	97
Figura 34	Microfotografia eletrônica de colifagos pertencentes à Família <i>Microviridae</i> (tipo Xφ174) isolados de plâncton (São Sebastião).....	97
Figura 35	Dendrograma construído com a técnica de BOX-PCR em isolados de colifagos, provenientes de amostras de água do mar, plâncton e bivalves do Canal de São Sebastião e Santos.....	99
Figura 36	Dendrograma construído com a técnica de ERIC-PCR em isolados de colifagos, provenientes de amostras de água do mar, plâncton e bivalves do Canal de São Sebastião, Santos e Ubatuba.....	101
Figura 37	RFLP com <i>EcoI</i>	103
Figura 38	Dendrograma construído com a técnica RFLP, usando a enzima <i>DraI</i> em isolados de colifagos, provenientes de amostras de água do mar, plâncton e bivalves do Canal de São Sebastião, Santos e Ubatuba.....	106
Figura 39	Diferenças estatisticamente significantes encontradas pelo método χ^2 Pearson nos colifagos testados com enzimas de restrição e rep-PCR.....	109
Figura 40	PCR para a detecção de LT/ST em colifagos.....	110
Figura 41	Árvore filogenética dos colifagos. Cladograma construída usando o método UPGMA.....	112

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE ITERATURA.....	26
2.1	Diversidade de microrganismos marinhos.....	26
2.2	Ecologia de fagos.....	27
2.2.1	Colifagos somáticos.....	28
2.2.2	Ecologia de fagos em ambientes aquáticos.....	29
2.3	Etapas do ciclo de replicação de fagos.....	32
2.4	Estratégia de sobrevivência dos fagos	37
2.5	Detecção e caracterização de bacteriófagos	38
2.5.1	<i>Myoviridae</i>	40
2.5.2	<i>Siphoviridae</i>	41
2.5.3	<i>Podoviridae</i>	42
2.5.4	<i>Microviridae</i>	42
2.5.5	<i>Inoviridae</i>	43
2.5.6	<i>Leviviridae</i>	44
2.6	Caracterização de bacteriófagos por RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	45
2.7	Biologia evolucionária dos fagos.....	46
2.8	Caracterização de perigos microbiológicos e análises de riscos no ambiente aquático.....	49
2.9	Caracterização de aérea de estudo.....	52
2.9.1	Canal de São Sebastião.....	53
2.9.2	Ubatuba-Saco da Ribeira.....	54
2.9.3	Santos-Baixada Santista.....	55
3	JUSTIFICATIVA.....	57
3.1	Objetivo Geral.....	58
3.2	Objetivos específicos.....	58
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1	Amostragem.....	59
4.1.1	Locais de estudo, período e pontos de coleta.....	59
4.1.1.1	Canal de São Sebastião.....	59
4.1.1.2	Baía de Santos.....	59

4.1.1.3	Ubatuba.....	60
4.1.2	Coleta de amostras de água de mar.....	60
4.1.3	Coleta de amostras de plâncton.....	60
4.1.4	Coleta de bivalves.....	60
4.2	Metodologia.....	60
4.2.1	Determinação dos parâmetros físico-químicos.....	60
4.2.2	Análises microbiológicas.....	61
4.2.2.1	Contagem de bactérias marinhas viáveis (BMV).....	61
4.2.2.2	Contagem de coliformes termotolerantes e <i>E.coli</i>	61
4.2.2.3	Contagem de enterococos intestinais(EI).....	61
4.2.2.4	Contagem de Vibrios.....	61
4.2.2.5	Determinação de Vibriófagos.....	62
4.2.2.6	Detecção de colifagos.....	62
4.2.2.6.1	Preparo da cultura estoque da cepa hospedeira.....	62
4.2.2.6.2	Processamento das amostras para o ensaio de detecção de colifagos.....	62
4.2.2.6.2.1	Amostra de água do mar.....	62
4.2.2.6.2.2	Amostras de plâncton.....	62
4.2.2.6.2.3	Amostras de bivalves	63
4.2.2.6.3	Leitura e expressão de resultados	63
4.2.2.6.4	Isolamento das placas de lise	63
4.2.2.6.5	Titulação dos colifagos isolados	63
4.2.2.7	Pesquisa de <i>Vibrio cholerae</i> pela técnica de enriquecimento	64
4.2.3	Análises moleculares	64
4.2.3.1	Extração de DNA cromossomal bacteriano	64
4.2.3.2	PCR para identificação de <i>V. cholerae</i> e multiplex PCR para a determinação da presença dos genes relacionados à virulência <i>ctxA/tcpA</i>	65
4.2.3.3	Caracterização molecular para Bactérias presuntivas de <i>V.cholerae</i> pelas técnicas de ERIC-PCR (<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences</i>) e BOX-PCR (<i>BOX-AIR-based repetitive extragenic palindromic</i>).....	65
4.2.3.4	Técnica de seqüenciamento para bactérias de <i>V.cholerae</i>	66
4.2.3.5	Indução de profagos em <i>V.cholerae</i> (MILLER, 1998).....	66
4.2.3.5.1	Procedimento de indução com luz ultravioleta	67

4.2.3.5.2	Procedimento de indução com mitomicina C	67
4.2.3.6	Caracterização de colifagos somáticos	68
4.2.3.6.1	Caracterização por microscopia eletrônica.....	68
4.2.3.6.2	Caracterização molecular de colifagos	68
4.2.3.6.2.1	Extração do ácido nucléico	68
4.2.3.6.2.1.1	Protocolo A. Modificação da técnica de Sambrook <i>et al.</i> , 1989.....	68
4.2.3.6.2.1.2	Protocolo B. Modificação da técnica de Lockett (1990).....	69
4.2.3.6.2.2	Caracterização do tipo de material genético do fago DNA/RNA	70
4.2.3.6.2.3	Caracterização do DNA dos colifagos utilizando enzimas de restrição.....	70
4.2.3.6.2.4	Detecção de genes associados à virulência em colifagos.....	70
4.2.3.6.2.5	Seqüenciamento dos genes associados à virulência.....	71
4.3	Análise dos resultados	72
4.3.1	Análise estatística.....	72
4.3.2	Análise dos agrupamentos obtidos usando a metodologia molecular.....	72
5	RESULTADOS.....	74
5.1	Caracterização das regiões pelos parâmetros físico-químicos.....	74
5.1.1	Canal de São Sebastião.....	74
5.1.2	Baixada Santista.....	75
5.1.3	Ubatuba.....	77
5.2	Análises microbiológicas.....	77
5.2.1	Caracterização microbiológica da área de São Sebastião.....	77
5.2.2	Caracterização microbiológica da área de Santos.....	78
5.2.3	Caracterização microbiológica da área de Ubatuba.....	80
5.3	Detecção de Vibriófagos.....	82
5.4	Pesquisa de <i>V.cholerae</i> pela técnica de enriquecimento.....	82
5.5	Seqüenciamento dos isolados presuntivos de <i>V.cholerae</i>.....	82
5.6	Relação das concentrações de colifagos somáticos com os parâmetros físico-químicos e microbiológicos estudados nos três ambientes.....	83
5.7	Indução de <i>V.cholerae</i> CTX (+).....	85

5.8	Caracterização morfológica e microscópica dos colifagos somáticos isolados.....	88
5.8.1	Amostras de água do mar.....	88
5.8.2	Amostras de plâncton.....	91
5.8.3	Amostras de bivalves.....	95
5.9	Caracterização molecular de fagos.....	98
5.9.1	Caracterização por Rep-PCR (BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR).....	98
5.9.1.1	BOX-PCR.....	98
5.9.1.2	ERIC-PCR.....	100
5.9.1.3	REP-PCR.....	102
5.9.2	Caracterização molecular usando as enzimas de restrição (RFLP)	102
5.10	Detecção dos genes que codificam para LT, ST, CTX e TCP associados à virulência.....	110
5.11	Seqüenciamento dos colifagos que apresentaram fatores associados à virulência.....	110
6	DISCUSSÃO.....	113
6.1	Caracterização físico-química e microbiológica da região costeira de São Paulo.....	113
6.2	Preservação de cepas de <i>V.cholerae</i> em glicerol.....	118
6.3	Indução de profagos de <i>V.cholerae</i>	119
6.4	Abundância de colifagos somáticos na região costeira de São Paulo.....	120
6.5	Caracterização molecular	125
6.5.1	Caracterização por rep-PCR.....	125
6.5.2	Caracterização por RFLP.....	126
6.6	Caracterização e seqüenciamento dos colifagos LT e ST positivos	127
7	CONCLUSÕES.....	130
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
	ANEXOS.....	152
Anexo A	Identificação por seqüenciamento dos isolados presuntivos de serem <i>V.cholerae</i> , usando o Genbank do BLAST e RDP II.....	152
Anexo B	Análise estatística da viabilidade celular das cepas clínicas de <i>V.cholerae</i> conservadas em glicerol.....	154
Anexo C	Análise estatística da viabilidade celular das cepas ambientais de <i>V.cholerae</i> conservadas em glicerol.....	155

1 INTRODUÇÃO

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 (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). Os microrganismos marinhos são abundantes. Por exemplo, numa gota de água do mar existem mais de 40.000 células de bactéria e arqueia. 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% restante são encontrados em águas profundas, sendo que a concentração dos microrganismos diminui gradualmente com a profundidade. Entretanto, nos sedimentos bênticos podem ser encontradas altas concentrações de microrganismos que participam nos processos geológicos e biológicos em escala global (UNITED NATIONS, 2008).

A contaminação da água é um dos maiores problemas de saúde pública, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, onde a diversidade e severidade das doenças veiculadas por águas contaminadas são maiores. Embora o número de epidemias atribuídas a patógenos bacterianos tenha diminuído, está crescendo o número de epidemias causadas por outros patógenos, sendo os vírus entéricos humanos mais importantes (SOBSEY *et al.*, 1995). Devido ao risco à saúde que estes vírus representam, é essencial a obtenção de maiores informações sobre o uso de indicadores de contaminação fecal que incluem dados sobre a presença dos vírus. A concentração viral pode exceder em 100 vezes à concentração bacteriana com um número total estimado na biosfera de 10^{31} partículas virais por mililitro (BERGH *et al.*, 1989; HELDAL e BRATBAK, 1991).

Sem dúvida, o maior reservatório dos vírus são os oceanos, onde a concentração varia de 10^4 a 10^7 /mL na coluna de água e mais de 10^8 /mL no sedimento (PAUL *et al.*, 1993; WOMMACK e COLWELL, 2000; BREITBART *et al.*, 2004; PAUL *et al.*, 2005). Isto tem resultado numa reavaliação da função dos vírus e especialmente os bacteriófagos na ecologia microbiana particularmente no ambiente marinho, pelos quais extensivos esforços têm se focado em entender o papel dos fagos na transferência horizontal dos genes e na mortalidade microbiana, e conseqüentemente no impacto sobre a abundância, a diversidade e a estrutura

das comunidades (PROCTOR e FUHRMAN, 1990; SUTTLE *et al.*, 1990; BREITBART *et al.*, 2007).

No ecossistema marinho, poucos são os estudos avaliando a frequência e diversidade de vírus. Entretanto, sabe-se que são muito abundantes em plâncton marinho, por serem parasitas obrigatórios, na ordem de 10^7 por mililitro (ABEDON, 2008). Estudos sugerem que os vírus são responsáveis por cerca de 10-40% da mortalidade das bactérias e, muitas vezes, a morte é devido à lise viral. Outra função dos vírus inclui a influência na composição e diversidade das comunidades e espécies e, principalmente, na transferência genética (FUHRMAN, 2000; WOMMACK e COLWELL, 2000).

Os bacteriófagos ou fagos (vírus que infectam bactérias) têm sido isolados de vários ambientes, incluindo os ecossistemas aquáticos e habitats terrestres. Os bacteriófagos foram descritos inicialmente por Spencer (1955), entretanto foram ignorados por três décadas devido à dificuldade de seu isolamento e cultivo no laboratório usando metodologias tradicionais (BREITBART *et al.*, 2007). Somente nos últimos anos foi reconhecido o papel dos bacteriófagos e sua abundância no ecossistema aquático (WOMMACK *et al.*, 1992; DEMUTH *et al.*, 1993; BREITBART *et al.*, 2007).

Devido à expansão das atividades antrópicas na região costeira marinha, tornou-se imperativa a necessidade de uma avaliação contínua da qualidade das águas litorâneas. A descarga de esgotos não tratados afeta a saúde do ecossistema marinho em duas formas: (1) poluição microbiana pela introdução de microrganismos patogênicos levados pelo homem, os quais podem afetar a saúde humana e (2) os poluentes químicos orgânicos e inorgânicos, que dependendo do tipo, podem afetar severamente as estruturas das comunidades dos ecossistemas (RIVERA *et al.*, 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, 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).

A qualidade microbiológica dos ambientes costeiros seja para uso de recreação ou cultivo de produtos marinhos é verificada usando bactérias intestinais como indicadores de contaminação fecal, em lugar da pesquisa de patógenos. A pesquisa de patógenos é cara,

demorada e muitas vezes não são detectáveis pelas técnicas convencionais (DUTKA *et al.*, 1987).

Os indicadores atuais da qualidade da água e dos processos de tratamento, tais como coliformes, coliformes termotolerantes e enterococos intestinais, indicam apenas a presença de poluição fecal e risco indireto à saúde (KOTT *et al.*, 1974). Esses grupos de bactérias não são indicadores apropriados de contaminação viral, devido às grandes variações nos padrões de sobrevivência existentes entre vírus e bactérias, pelo maior tempo de persistência no ambiente e porque são mais resistentes aos processos de desinfecção (PAYMENT e ARMON, 1989; PAYMENT e FRANCO, 1993).

A American Public Health Association (APHA) recomenda a quantificação de colifagos para avaliar a qualidade microbiológica da água. Pesquisas indicam que os colifagos somáticos são mais prevalentes aos colifagos F-específicos (CORNAX *et al.*, 1991; RICCA e COONEY, 1999), devido principalmente a uma maior resistência frente às altas radiações solares (SINTON *et al.*, 1999). Por isso, estudos sobre a diversidade de colifagos somáticos em ambientes aquáticos é importante para avaliar o uso potencial desses vírus como indicadores da presença de bactérias patogênicas e de vírus entéricos.

Estudos detalhados da morfologia de fagos que infectam específicas células hospedeiras em ambientes naturais foram descritos por Ackermann e Nguyen, 1983 e Frank e Moebus, 1987. Atualmente está sendo usada a microscopia eletrônica para a sua classificação baseada no tamanho e morfologia dos fagos (SULLIVAN *et al.*, 2003).

Para análise morfológica ou genômica, os bacteriófagos podem ser divididos em tipos (ACKERMANN, 2006; International Committee on Taxonomy Viruses (ICTV), 2008). Em termos de tipo de ácido nucléico, podem ser divididos em: ssDNA, dsDNA, ssRNA e dsRNA. Em termos de morfologia podem ser: com cauda, isométricos, helicoidais e fagos pleomórficos. Todos os fagos com cauda (ordem *Caudovirales*) tem dsDNA e podem ser diferenciados dentro das famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*. Entre os fagos isométricos, se encontram os quatro tipos de genomas, incluindo os fagos segmentados dsRNA (família *Cystoviridae*). Fagos helicoidais e pleomórficos estão mais representados pelos fagos com genoma ssDNA, com a exceção da família *Inoviridae* (fagos helicoidais filamentosos).

Os fagos que infectam *Escherichia coli*, são chamados de colifagos e pertencem a seis famílias taxonômicas: três de cadeia dupla, *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*, duas de cadeia simples (ss) DNA, *Microviridae* e *Inoviridae*, e a família *Leviviridae* (ssRNA) (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000).

Um pouco mais de 5.000 fagos têm sido caracterizados desde 1959 por microscopia eletrônica (ACKERMANN, 2001). Destes, menos de 3% têm sido completamente seqüenciados e disponibilizados em bancos de dados genômicos (FOUTS, 2006). Considerando a estimativa de 1030 fagos existentes no mundo (BRUSSOW e HENDRIX, 2002), é clara a necessidade de conhecer o genoma dos fagos para compreender a verdadeira extensão da diversidade genética e a capacidade para a mobilização/troca e evolução dos bacteriófagos. Até isto acontecer existe uma enorme pobreza na exploração genômica dos bacteriófagos, assim como de sua diversidade e interação nos ecossistemas (FOUTS, 2006; BREITBART *et al.*, 2007).

A biodiversidade e conservação dos ecossistemas de água doce e costeira não são objetos separados da sustentabilidade de água limpa e a segurança alimentar, mas parte integral de um mesmo programa. Entretanto, dados sobre a diversidade e qualidade da água existem somente para alguns grupos de espécies, habitats e regiões, existindo ainda grandes “falhas” na informação disponível sobre a extensão e qualidade dos ecossistemas aquáticos (UNITED NATIONS, 2006)

Neste trabalho teve-se como objetivo quantificar colifagos somáticos em ecossistemas aquáticos marinhos com diferente grau de poluição antrópica, e relacioná-los com os indicadores microbiológicos e os parâmetros físico-químicos. E estudar a diversidade de colifagos somáticos isolados de amostras de água do mar, plâncton e bivalves da região costeira do Estado de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diversidade de microrganismos marinhos

Elliot Norse e colaboradores introduziram o termo “diversidade biológica” para definir diversidade em três níveis de complexidade: (i) genética (diversidade entre espécies), (ii) de espécies (número de espécies) e (iii) ecológica (diversidade da comunidade) (HARPER e HAWKSWORTH, 1995). Porém, a expressão contraída “biodiversidade” tornou-se mais comum (WILSON e PETER, 1988). Esta definição de biodiversidade pode não ser precisa, uma vez que o conceito de espécies é amplo na área de microbiologia (ROSSELLÓ-MORA e AMANN, 2001). Sendo assim, vários revisores têm proposto, por exemplo, usar diversidade de organismos no lugar de diversidade de espécies, a fim de reconhecer a diversidade como o maior nível taxonômico (BULL e STACH, 2004).

A diversidade que nós vemos hoje em comunidades microbianas é o resultado de cerca de quatro bilhões de anos de evolução e pode ser vista de várias maneiras, como por exemplo, através das variações no tamanho e morfologia da célula, estratégias metabólicas, mecanismos de divisão celular, patogenicidade, adaptação aos ambientes extremos e outros aspectos da biologia celular (MADIGAN e MARTINKO, 2006).

A maneira mais simples de determinar a biodiversidade é através da riqueza das espécies, isto é, do número de espécies presentes em uma determinada área ou habitat. Outra maneira ecológica de determinar a biodiversidade é através da abundância de espécies. Outro componente da biodiversidade é a diversidade funcional que é medida pela variação de espécies em um habitat ou região, de acordo com as suas características metabólicas (TILMAN e LEHMAN, 2001).

A riqueza conhecida e estimada da diversidade microbiana está representada por 75 mil e 1,5 milhões espécies de fungos, 4.900 mil e um milhão de bactérias e 4.000 e 400 mil de vírus. Esses dados sugerem que o número de espécies descritas de fungos, bactérias e vírus são 5, 0,5 e 1%, respectivamente, do número total de espécies existentes (HAMMOND, 1995; HAWKSWORTH, 2001; FROESE e BISBY, 2002). As bactérias, fungos (bolores e leveduras) e vírus estão presentes naturalmente nas águas e sedimentos, tendo um papel essencial na mineralização e troca de nutrientes necessários para o desenvolvimento de plantas e animais (COLWELL, 1978).

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 a 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. Isto é vital para assegurar o desenvolvimento sustentável dos recursos marinhos e costeiros (UNITED NATIONS, 2008).

2.2 Ecologia de Fagos

Os vírus bacterianos são ubíquos e constituem o maior grupo de vírus. Ocorrem em *Eucarya* e *Archaea*, tanto como profagos em hospedeiros específicos como também livres na natureza em uma ampla variedade de habitats (ACKERMANN, 1996).

A ecologia de bacteriófagos pode ser definida como a interação do vírus com seus hospedeiros no ecossistema e os efeitos de tais interações na composição e produtividade de um determinado habitat (PRIMROSE *et al.*, 1982).

Embora os bacteriófagos tenham sido isolados de muitos habitats, sua quantificação em estudos ecológicos está ainda pouco definida. A maior limitação tem sido a falta de uma técnica para a determinação de seu número total (ABEDON, 2008).

Os fagos do ambiente são detectados por duas metodologias básicas: o plaqueamento e a microscopia eletrônica. A técnica mais popular, quase que universalmente utilizada, é a do enriquecimento do fago, cultivando-o com o hospedeiro adequado. A identificação é feita pelo tipo de hospedeiro e a morfologia feita pela microscopia eletrônica (ACKERMANN, 2006).

Em habitats onde os vírus estão presentes em concentrações ínfimas dificilmente detectáveis pelo plaqueamento direto, torna-se imprescindível a concentração viral a partir de grandes volumes de água (PRIMROSE *et al.*, 1982). No entanto, em outros estudos observaram-se que os métodos usados para concentração de vírus a partir de águas naturais, não são adequados para a concentração de bacteriófagos e propõem a adaptação desse método para concentração de fagos. Esta adaptação consiste da passagem da água através de filtros de areia, remoção do material orgânico dissolvido com uma resina de troca iônica, adição de cloreto de magnésio, ajuste de pH para 3,8, adsorção do bacteriófago a filtros de fibra de vidro e nitrato de celulose, eluição com extrato de carne e concentração por ultra-centrifugação (SEELEY e PRIMROSE, 1979).

De uma forma geral, os fagos possuem o mesmo habitat dos seus hospedeiros. O habitat mais importante de fagos é a bactéria lisogênica, cerca da metade dos fagos conhecidos têm sido isolados de hospedeiros lisogênicos, ou foi observado após isolamento

do ambiente, que eles são temperados (integram o seu ácido nucléico no DNA da célula hospedeira, dando origem a um profago). Em bactérias esporuladas, os fagos podem ser perpetuados como profagos ou como inclusões dentro dos esporos (ACKERMANN e DUBOW, 1987).

No ambiente os bacteriófagos têm sido detectados em ecossistemas que permitem a multiplicação bacteriana, como água, solo, fezes, rúmem bovino, sedimentos e esgoto (GOYAL, 1987).

Vários estudos, utilizando a microscopia eletrônica, foram publicados sobre a morfologia de bacteriófagos que infectam diferentes bactérias como *Salmonella* (ACKERMANN e GERSHMAN, 1992), *Enterobacter* (LOESSBER *et al.*, 1993), *Bacillus* (ACKERMANN *et al.*, 1994a), *Acinetobacter* (ACKERMANN *et al.*, 1994b), *Streptococcus thermophilus* (BRUSSOW *et al.*, 1994), *Lactococcus* (OLIVEIRA *et al.*, 1995) e cianofagos (WILSON *et al.*, 1993).

2.2.1 Colifagos somáticos

Os bacteriófagos que infectam *E.coli* são denominados colifagos e normalmente detectados em fezes de humanos, porcos, galinhas, bovinos e outros animais (DHILLON *et al.*, 1976; OSAWA *et al.*, 1981; HAVELAAR *et al.*, 1986, 1990; CORNAX *et al.*, 1994; GRABOW *et al.*, 1995).

Em amostras de fezes, as contagens variam entre $<10-10^8$ Unidades Formadoras de Placas por grama de amostra (UFP/g), sendo as maiores contagens normalmente encontradas em fezes de porcos, bezerros e galinhas. Em fezes humanas, os colifagos somáticos estão em números mais baixos (normalmente 10^3 UFP/g) (FURUSE, 1983).

Seeley e Primrose (1980) detectaram colifagos em águas pouco poluídas onde as contagens eram maiores quando incubados a 20 °C do que a 37 °C. Esses autores dividiram os colifagos em três classes com base nas variações de temperatura para crescimento: fagos LT (temperaturas baixas, 15 °C a 30 °C), fagos MT (temperaturas médias, 15 °C a 45 °C) e fagos HT (temperaturas altas, 25 °C a 45 °C).

Águas de esgoto doméstico normalmente contêm números elevados de colifagos somáticos e ocorrem em concentrações variando entre 10^5 e 10^7 UFP/L (BITTON, 1987).

Os colifagos foram detectados em uma ampla variedade de águas naturais incluindo lagos, rios e córregos, em diferentes localidades, com números de até 10^5 UFP/L (FARRAH, 1987).

Hernandez-Delgado *et al.* (1991) detectaram colifagos somáticos em amostras de águas doces de locais contaminados por esgoto, mas não em águas pristinas. Foi observado que os colifagos somáticos persistem, mas não se replicam em ambientes aquáticos tropicais (HERNANDEZ-DELGADO e TORANZOS, 1995).

Araujo e colaboradores em 1997 mediram os níveis de colifagos somáticos em amostras de águas doces com diferentes graus de poluição fecal. Em 100% das amostras foram registrados valores entre 10^3 e 10^6 UFP/100 mL e de 10^4 a 10^7 UFP/100g em amostras de sedimentos e lodos provenientes de estações de tratamento de esgoto. Em amostras de águas com menor grau de poluição fecal as contagens foram entre 10^2 e 10^5 UFP/100 mL e em águas subterrâneas de <10 a $6,8 \times 10^2$ UFP/100 mL.

2.2.2 Colifagos em ambientes aquáticos

Os colifagos somáticos encontram-se em abundância em águas poluídas e residuárias, as populações de colifagos excedem às dos vírus entéricos, são incapazes de reproduzir-se fora da bactéria hospedeira, podem ser isolados e quantificados por métodos simples, o intervalo entre a amostragem e o resultado final é mais curto do que os vírus entéricos, muitos colifagos são mais resistentes à inativação e à desinfecção quanto os vírus entéricos. Kott em 1981 baseando-se nestas características propôs o uso dos colifagos somáticos como indicadores de vírus entéricos humanos.

Simkova e Cervenka (1981) realizaram um estudo sobre a ocorrência de colifagos e vírus entéricos em quatro tipos de águas: rios, poços, esgotos e canais de irrigação. Estes pesquisadores verificaram uma concordância em termos de presença e ausência e que as variações sazonais seguiam um mesmo padrão para colifagos e vírus entéricos. Seus resultados sugeriram que os colifagos seriam bons indicadores de poluição fecal e da presença de vírus entéricos em águas, além de fornecer uma boa indicação de sobrevivência de poliovírus.

Muitos autores têm sugerido o uso de colifagos como indicadores de poluição fecal de água por eles estarem sempre presentes em fezes humanas e em águas de esgoto (DHILLON *et al.*, 1976; HAVELAAR, 1990; ARAUJO *et al.*, 1997). Em soma, o ensaio para a detecção e enumeração de fagos é de fácil execução, rápido e barato (VAUGHN e METCALF, 1975; SOBSEY *et al.*, 1995).

Kenard e Valentine (1974) mostraram haver uma alta correlação entre coliformes termotolerantes e colifagos em amostras de águas naturais com diferentes graus de poluição e concluíram que a quantidade de coliformes poderia ser estimada pelo número de colifagos.

Vaughn e Metcalf (1975) estudaram a ocorrência de colifagos e vírus entéricos em águas de esgoto e estuarinas e mostraram que os colifagos eram mais freqüentes em amostras de esgoto do que em enterovírus. Observaram ainda que 63% das amostras de enterovírus foram negativas para colifagos. No entanto, esses resultados podem ter ocorrido, em parte, devido ao método utilizado para a recuperação dos vírus (GERBA, 1987).

Wentsel *et al.* (1982) pesquisaram coliformes, coliformes termotolerantes e colifagos em aproximadamente 600 amostras de águas naturais (rios e lagos) e a análise estatística dos dados mostrou que a correlação entre coliformes termotolerantes e colifagos era altamente significativa. Também detectaram colifagos em água potável na ausência de coliformes, provavelmente devido à maior resistência dos colifagos aos processos de tratamento de água.

Grabow *et al.* (1984) avaliaram os colifagos como indicadores da qualidade virológica da água e compararam a sua concentração em amostras de águas tratadas, rios, represas e águas de esgoto com os números de vírus entéricos e de indicadores bacterianos (contagem de bactérias heterotróficas, coliformes termotolerantes, bactérias ácido resistentes e enterococos intestinais). Embora a contagem de colifagos não tenha sido diretamente correlacionada com a de vírus entéricos, os autores concluíram que os colifagos possuíam os requisitos básicos de um indicador da qualidade virológica da água e que sua ausência em águas tratadas indicaria a ausência de vírus entéricos, sugerindo o uso dos colifagos em conjunto com os indicadores bacterianos.

A detecção de colifagos em águas potáveis (EL ABAGY, 1988; CASTILLO *et al.*, 1988) é uma indicação da sua resistência aos processos de tratamento e os colocam como indicadores potenciais da eficiência do tratamento de água. O uso de colifagos como organismos modelos para a presença de enterovírus depende de vários fatores, tais como a escolha da cepa hospedeira e o método utilizado para a concentração e recuperação dos vírus em grandes volumes de água (SOBSEY *et al.*, 1995).

Existem vários trabalhos onde foi observada a correlação entre colifagos somáticos e indicadores de bactérias patogênicas. A relação entre colifagos e microrganismos patogênicos (*Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*) em amostras de águas naturais foi estudada por Borrero *et al.* (1987). Os resultados indicaram correlação entre colifagos, *Salmonella* spp. e *P.aeruginosa*, sugerindo os colifagos como bons indicadores da presença de microrganismos patogênicos.

Dutka *et al.* (1987) investigaram a presença de colifagos e coliformes termotolerantes em amostras de águas de rios, lagos e praias e observaram haver correlação positiva entre os indicadores para todas as amostras.

Loh *et al.* (1988) examinaram águas superficiais e subterrâneas e relataram uma alta correlação entre coliformes termotolerantes e colifagos.

Borrero *et al.* (1990) realizaram um estudo comparativo entre as taxas de sobrevivência de indicadores bacterianos coliformes termotolerantes e enterococos intestinais, colifagos somáticos e *Salmonella* spp. em águas fluviais e marinhas e seus resultados mostraram uma taxa de inativação dos colifagos similar à de *Salmonella* para todos os tipos de águas.

Martins *et al.* (1990) analisaram águas brutas e tratadas, de diferentes localidades do Estado de São Paulo, através das técnicas para detecção de colifagos e bactérias indicadoras (membrana filtrante, tubos múltiplos, presença-ausência e teste do H₂S). Observaram que os colifagos apresentavam uma boa correlação com os outros indicadores bacterianos, mas não foram isolados de águas tratadas e de poços, mesmo onde houve detecção de coliformes termotolerantes.

Martins *et al.* (1991) realizaram um estudo com águas subterrâneas de cemitérios de São Paulo e detectaram coliformes termotolerantes em todas as amostras estudadas, mas não isolaram colifagos, provavelmente devido à sua adsorção às partículas de solo durante seu carregamento até o lençol freático.

Cornax *et al.* (1991) estudaram a relação entre os grupos de fagos (colifagos somáticos, bacteriófagos F-específicos e fagos *Bacteroides fragilis*) com bactérias indicadoras (coliformes termotolerantes e enterococos intestinais) em águas do mar com diferentes níveis de poluição fecal. Pelos resultados obtidos, os autores concluíram que os enterococos intestinais e os colifagos somáticos seriam os indicadores mais apropriados de contaminação remota em águas marinhas, pois em amostras pouco poluídas, esses indicadores apresentaram contagens maiores do que os coliformes termotolerantes e outros bacteriófagos.

Moriñigo *et al.* (1992) avaliaram a qualidade microbiológica de diferentes tipos de águas (fluviais e marinhas) através da detecção de colifagos e de coliformes termotolerantes, foi observada uma boa correlação entre esses indicadores, sugerindo aos colifagos como bons indicadores da presença de bactérias patogênicas e de vírus entéricos na água.

Os colifagos também têm sido considerados indicadores de vírus entéricos humanos, devido às suas semelhanças estruturais, às altas concentrações em águas de esgoto e em fezes e à sua simplicidade de detecção (SOBSEY *et al.*, 1995).

Pedroso (1993), no trabalho de pesquisa intitulado: “Fatores que podem interferir na detecção de colifagos, indicador microbiológico da qualidade de água” comparou quatro metodologias para a quantificação de colifagos (técnica ARCAT, dos tubos múltiplos-TM, de plaqueamento direto T100 e bacteriófagos F-específicos em amostras de águas naturais (rios, poços, lagos, nascentes, represas, cachoeiras) no Estado de São Paulo. Os resultados deste estudo demonstraram que a técnica ARCAT apresentou correlação com os coliformes termotolerantes, sendo uma metodologia rápida, econômica e de fácil execução.

Mehnert e Stewien (1993) realizaram a primeira investigação de rotavírus em águas de esgotos e córregos poluídos na cidade de São Paulo, entre 1987 e 1988, utilizando imunofluorescência indireta e a imunoperoxidase direta.

Do Val (1997) estudou a diversidade de colifagos em amostras de água doce com diferentes graus de poluição, coletadas no Estado de São Paulo, e em amostras de fezes de humanos e animais sadios. As contagens de colifagos variaram de <5 a 10^4 UFP/100 mL em ambientes aquáticos e de 10 a 10^8 UFP/g em amostras de fezes de animais e humanos sadios.

Posteriormente, entre 1998 e 2003, foram realizados outros estudos sobre a presença de vírus em águas doces, utilizando-se métodos moleculares, nos quais foram identificadas as presenças de vírus de hepatite A (HAV) (SASSAROLI *et al.*, 2000), rotavírus (QUEIROZ *et al.*, 2001; PAULI *et al.*, 2003) e adenovírus (SANTOS *et al.*, 2001; GARRAFA *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2003) em águas de esgotos, córregos e águas de poços.

2.3 Etapas do ciclo de replicação de fagos

Os fagos não têm metabolismo próprio e, por esse motivo, necessitam do metabolismo, dos recursos energéticos e dos recursos materiais dos seus hospedeiros para se replicarem. O processo de replicação de fagos é comum a todos os vírus e compreende várias etapas (Tabela 1) (DUCKWORTH *et al.*, 1981).

Os colifagos de acordo com o local de adsorção na célula hospedeira são classificados em: (1) colifagos somáticos, que adsorvem a receptores situados na parede celular (receptores somáticos) e (2) bacteriófagos F-específicos, que adsorvem especificamente ao pili F bacteriano ou pili sexual. O pili sexual é codificado pelo gene do plasmídio F ou sexual, um elemento genético extra cromossômico encontrado em cepas masculinas ou F⁺ de *E.coli* (IAWPRC STUDY GROUP, 1991; SOBSEY *et al.*, 1995). Esses plasmídios podem ser transferidos por conjugação bacteriana de células masculinas (F⁺) a células femininas (F⁻) (SOBSEY *et al.*, 1995).

Tabela 1 – Etapas de um processo de replicação fágico.

Processo de replicação fágico
1. Adsorção
2. Separação do ácido nucléico da proteína
3. Expressão e replicação do ácido nucléico
a. mRNA pré-inicial e síntese protéica
b. mRNA inicial e síntese protéica
c. replicação do ácido nucléico
d. mRNA final e síntese protéica
4. Formação de novas partículas fágicas
5. Libertação de novos fagos processo de replicação fágico

O primeiro estágio da infecção, designado por adsorção, é bastante complexo, sendo constituído por três fases: o contacto inicial, a ligação reversível e a ligação irreversível. Tal como todos os vírus, os fagos ligam-se a receptores específicos existentes na superfície dos hospedeiros para iniciar a replicação (LEVINE, 1939).

O contacto inicial do fago com as células é feito através de efeitos de difusão e movimentos Brownianos. Segue-se uma ligação reversível (ligação fraca) que pode incluir a associação de qualquer estrutura fágica à superfície celular, existindo forças eletrostática para implementar a adesão não específica. Esta associação não específica é seguida por uma interação reversível específica com uma estrutura na superfície celular. Esta estrutura pode ser ou não o receptor para a ligação irreversível.

Na última fase da adsorção ocorre a ligação irreversível (ligação forte) entre o fago e os receptores. O número e tipo de receptores da superfície bacteriana variam bastante e por vezes as moléculas reconhecidas pelo fago são componentes essenciais da superfície celular (GOYAL, *et al.*, 1998). A superfície externa de células procarióticas apresenta um conjunto de particularidades que inclui material estrutural (glicoproteínas e lipopolissacáridos) maquinaria de transporte (aminoácidos ou complexos transportadores de açúcares) e aparelhos de interação entre células (o *pilus F*). A adesão de fagos às células hospedeiras pode empregar qualquer uma destas estruturas, dependendo do fago (WAGNER e HEWLETT, 1999). Na tabela 2 encontram-se alguns dos receptores para determinados fagos de *E.coli*. Virtualmente, qualquer componente existente na superfície é usado por algum fago como sítio específico de adesão, nem que tenha de haver, em certos casos, um rearranjo físico da partícula fágica.

Posteriormente ocorre a compressão da cauda contráctil e injeção do DNA fágico para o interior da célula hospedeira através da penetração da parede celular pelo tubo da cauda do

fago (Figura 1). O DNA fágico tem ainda que atravessar a membrana interna da célula com a ajuda de um produto viral denominado proteína piloto (WAGNER e HEWLETT, 1999).

Tabela 2 – Receptores de alguns bacteriófagos de *E. coli*.

Vírus	Estrutura	Função normal
T2	Proteína da Membrana Externa F Lipopolissacarídeos	Porina protéica Estrutura da membrana externa
T4	Proteína da Membrana Externa C Lipopolissacarídeos	Porina protéica Estrutura da membrana externa
T6	Tsx	Proteína transportadora de nucleósidos
T1 e T5	TonA	Transporte de ferrocromo
A	LamB	Proteína transportadora de maltose
MS2	F pilus	Conjugação

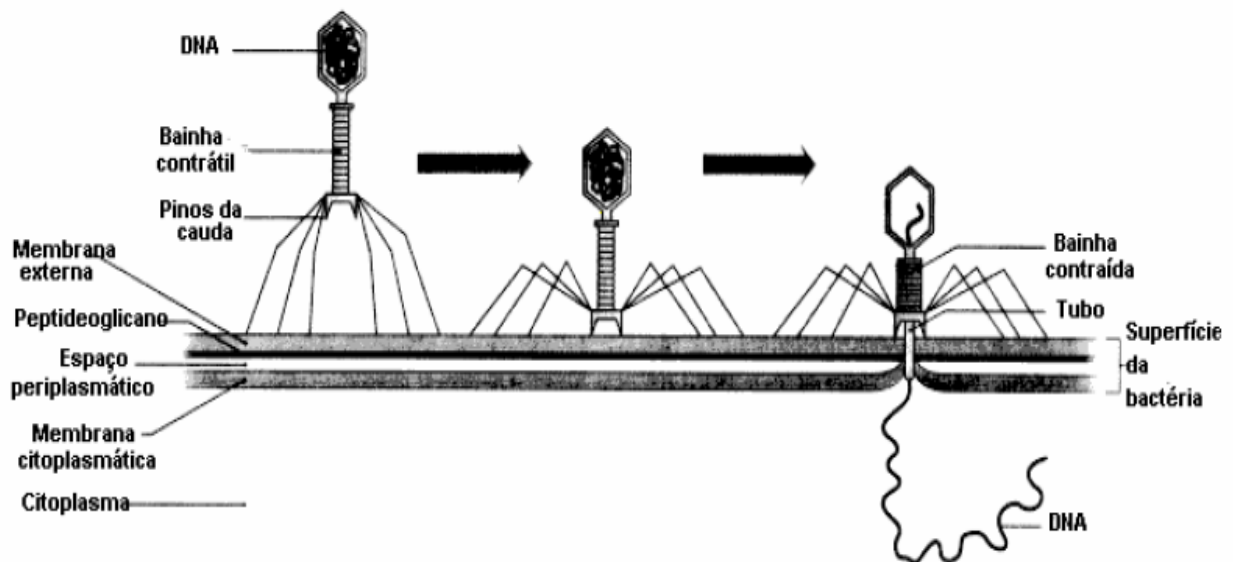


Figura 1- Adsorção do fago a uma célula hospedeira e conseqüente penetração por injeção do ácido nucléico.

Fonte: PELCZAR *et al.*, 1993.

A quantidade atual de fago que entra na célula hospedeira é variável. No caso de fagos com cauda, apenas o DNA fágico e certas proteínas acessórias entram na célula. Em fagos sem cauda (ex.: MS2) a partícula fágica entra inteiramente na célula passando para o citoplasma.

Após a ligação irreversível do fago à superfície da célula parte ou todo o virião entra na célula resultando na libertação do material genômico do fago no seu interior. Durante a

transformação bacteriana, a membrana celular é modificada, de forma a tornar a célula competente para a entrada do DNA fágico, através da introdução de novas proteínas na membrana celular (ZOON *et al.*, 1976). A parede celular da célula torna-se penetrável podendo a penetração dos vírus nas células ocorrer de quatro modos distintos: injeção do ácido nucléico, endocitose, fusão do envelope fágico e translocação. Os fagos que penetram por endocitose, após a sua ligação ao receptor, são englobados pela membrana plasmática, ficando no interior de vesículas nas células.

Estas vesículas podem fundir com endossomas para posterior digestão da cápside viral libertando, desse modo, o ácido nucléico. Os fagos com envelope adotam o método de fusão no qual ocorre uma fusão entre o envelope e a membrana celular, libertando-se o cápsido dentro da célula (ZOON *et al.*, 1976). O vírus interage com a célula hospedeira em duas formas, para expressão e replicação do ácido nucléico. Após a entrada do ácido nucléico fágico numa bactéria existem vários tipos de ciclos fágicos (Figura 2).

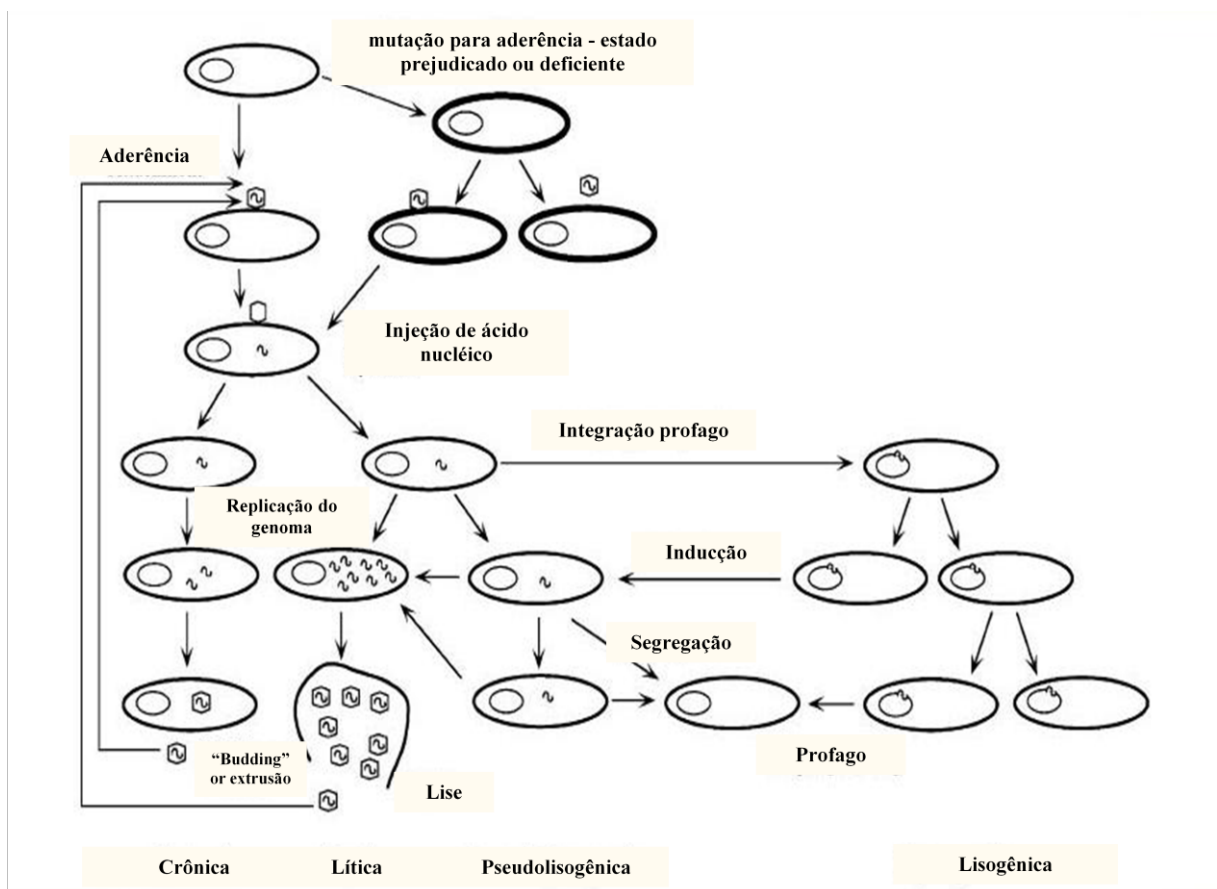


Figura 2- Tipos de ciclos fágicos.

Fonte: O modelo foi adaptado de WEINBAUER, 2004.

No caso de fagos com resposta lítica (causada por fagos virulentos) o fago redireciona o metabolismo do hospedeiro para a produção de novos fagos que são liberados através da lise da célula.

A resposta lisogênica de fagos resulta na criação de DNA fágico a partir do cromossomo do hospedeiro. Nestes casos, o fago replica-se sem causar a lise das células, ou seja, o fago permanece num estado dormente (profago) e replica juntamente com o hospedeiro (LURIA *et al.*, 1978; KORNBERG, 1980).

A resposta pseudolisogênica ou infecção persistente de fagos resulta na multiplicação de apenas uma fração da população. Neste tipo de resposta a taxa de infecção é reduzida devido à disponibilidade limitada de receptores, perda enzimática de receptores ou imunidade de fagos temperados à superinfecção. Este fato permite a presença simultânea de fagos e bactérias numa cultura (BARKSDALE e ARDEN, 1974).

A resposta do tipo infecção crônica ocorre quando uma célula é infectada e a progênie do fago é constantemente liberada da célula hospedeira por exclusão sem ocorrer a lise da célula. É comum agruparem-se em fagos virulentos (resposta lítica) e em fagos temperados (resposta lisogênica). Nos fagos temperados as células infectadas permanecem vivas enquanto o fago se encontra na fase de latência (ABEDON, 2008). O estado de latência ocorre como resultado da síntese de um repressor protéico, após a entrada do DNA fágico na célula. Este repressor adere a certos locais do DNA fágico e previne a replicação normal do DNA da célula. Por outro lado, se a célula for sujeita a algum estresse, o repressor pode ser inativado o que iniciará a resposta lítica. Sendo assim, um fago temperado pode iniciar tanto uma resposta lítica como lisogênica (HERSHEY, 1971; KORNBERG, 1980; LURIA *et al.*, 1978).

Outros fagos denominados filamentosos, não são classificáveis em virulentos ou temperados. Estes fagos aderem ao *pili* de F⁺ e as células infectadas continuam a crescer e a produzir novos fagos que são segregados através da parede celular sem que ocorra lise celular (DENHART, 1975).

Nos fagos com cauda foi sugerido um processo padrão de morfogêneses onde a produção de uma descendência fágica em função do tempo pode ser descrita por uma curva de “*one step growth*” (Figura 3).

A fase do período de latência antes da formação dos fagos maduros é designada por período de eclipse (SILLANKORVA, 2004). O período de latência caracteriza-se pela acumulação intracelular de fagos à qual se segue a liberação para o meio extracelular. O período de aumento é caracterizado pela liberação exponencial de fagos maduros no ambiente extracelular devido à lise celular e pela detecção de fagos livres, atingindo-se um valor

máximo no final do ciclo. Pode-se, calcular, para cada sistema fago/hospedeiro, o número médio de fagos liberados por célula infectada designado vulgarmente por “*burst size*” (ACKERMANN, 1999).

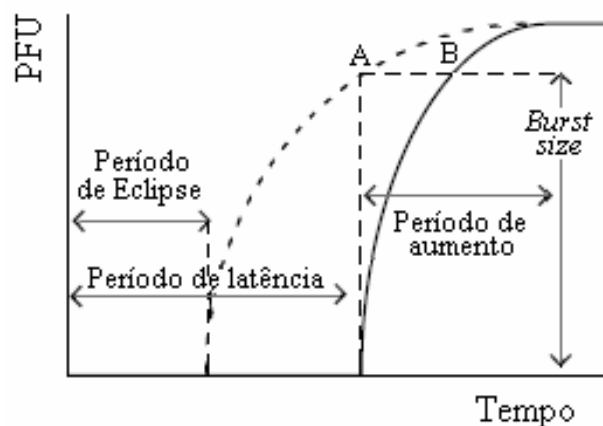


Figura 3- Representação gráfica de uma curva de *one step growth* para um fago lítico (T4).

Fonte: SILLANKORVA, 2004.

2.4 Estratégia de sobrevivência dos fagos

Para garantir a sobrevivência do fago é fundamental que não ocorra a lise total das células hospedeiras, uma vez que sem a presença de células hospedeiras o fago não consegue sobreviver por muito tempo. Alguns fagos desenvolveram estratégias alternativas para os normais ciclos virais de multiplicação – os ciclos “*live and Let live*” e outros mutaram alterando as proteínas da cápsula o que lhes permite a ligação a novos receptores. Os fagos que sofreram mutação desenvolveram, através da alteração da gama de hospedeiros, a capacidade de entrar em ambientes completamente novos (LEVINE, 1939).

Tanto os fagos temperados como os virulentos têm a capacidade de inibir os fagos infecciosos, homólogos ou heterólogos, resultando no que se denomina de exclusão mútua entre fagos relacionados e não relacionados. Estas interações entre elementos extracromossomais bacterianos, mais do que qualquer outro fator, determinam se uma bactéria será infectada por um determinado fago. Os mecanismos usados pelos elementos extracromossomais (plasmídios ou fagos) para prevenir a infecção dos hospedeiros pelos fagos inclui a indução da imunidade, a alteração da superfície celular para produzir resistência (impossibilitando a adsorção do fago), exclusão de DNA superinfectante, restrição

endonucleótida do DNA e infecção abortiva ou interferência no crescimento (DUCKWORTH *et al.*, 1981).

2.5 Detecção e caracterização de bacteriófagos

Os fagos encontram-se divididos em seis grupos conforme o tipo morfológico, tipo de ácido e hospedeiro. Os fagos podem ser tanto de DNA (cadeia simples (ss) ou de cadeia dupla (ds)) ou de ARN (cadeia simples (ss) ou de cadeia dupla (ds)). Os fagos de DNA de cadeia dupla podem ser: fagos com cauda contráctil (A), com cauda não-contráctil (B), com cauda curta (C), fagos sem cauda (D3) e fagos pleomórficos protegidos por um invólucro lipídico (G). Os fagos de DNA de cadeia simples são bastante diferentes podendo ser icosaédricos (D1 e D2) ou filamentosos (F1 e F2) (Figuras 4 e 5).

Os fagos do grupo E são icosaédricos com ARN de cadeia simples (E1) ou dupla (E2). Cerca de 96% dos fagos estudados possui cauda e estão divididos em três famílias distintas, tendo em conta as características morfológicas destas. Cerca de 60% dos fagos com cauda longa e não contráctil pertencem aos *Siphoviridae*, 25% dos fagos com cauda contráctil são *Myoviridae* e os de cauda curta e não contráctil são *Podoviridae* (ACKERMANN, 1996).

O sistema de classificação dos fagos é regularmente atualizado e aprovado pelo Comitê Internacional da Taxonomia de Vírus (ICTV). De acordo com o ICTV os fagos são classificados com base nas propriedades indicadas na tabela 3.

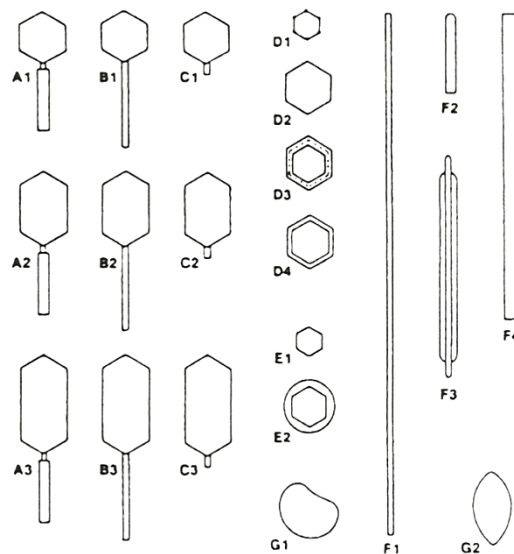


Figura 4- Morfotipos de bacteriófagos.

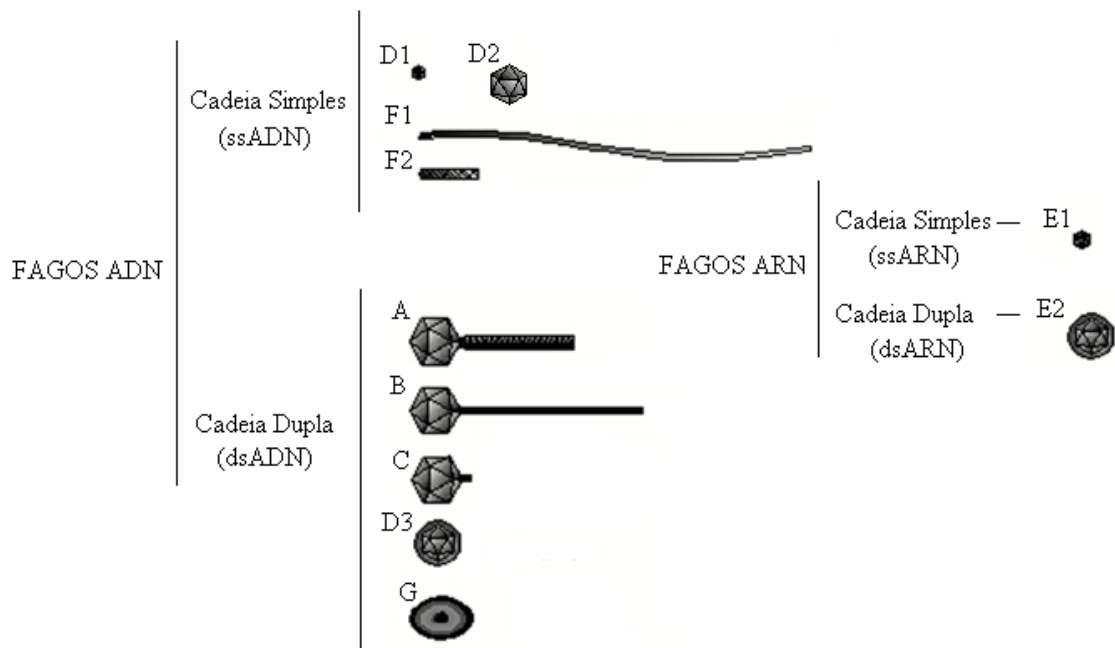
Fonte: DO VAL, 1997.

Tabela 3- Algumas propriedades dos fagos utilizadas na taxonomia (ICTV).

Propriedades	Características observadas
Morfologia	Tamanho, forma, presença ou ausência de envelope, simetria do capsídio, estrutura.
Propriedades Físicas e químicas	Massa molecular, coeficiente de sedimentação, estabilidade, pH, temperatura, cátions, solventes, detergentes, etc.
Proteínas	Tamanho do genoma (390/kbp), ácido nucléico (simples ou cadeia dupla), genoma linear ou circular, número e tamanho de segmentos, etc.
Lipídeos	Número, tamanho, atividade funcional das proteínas estruturais e não-estruturais. Detalhes de proteínas com atividade funcional especial.
Propriedades biológicas	Conteúdo, características, etc.
	Hospedeiro, modo de transmissão no ambiente, distribuição geográfica, patogenicidade, etc.

Fonte: SILLANKORVA, 2004.

A classificação utilizada atualmente foi descrita por Ackerman *et al.* em 1996. O ICTV classifica os bacteriófagos em doze famílias, cujos morfotipos correspondentes são descritos por Ackermann e Eisenstark (1974): *Myoviridae* (A1 e A3), *Siphoviridae* (B1 e B3), *Podoviridae* (C1 e C3), *Microviridae* (D1), *Corticoviridae* (D3), *Tectiviridae* (D4), *Leviviridae* (E1), *Cystoviridae* (E2), *Inoviridae* (F1 e F2), *Lipothrixviridae* (F3), *Plasmaviridae* (G1) e grupo SSVI (G2). Os morfotipos D2 e F4 ainda não foram classificados em famílias.

**Figura 5-** Classificação dos fagos com base na morfologia e no tipo de ácido nucléico.

Fonte: ACKERMANN, 1992.

Os colifagos são encontrados em seis famílias, descritas a seguir:

2.5.1 *Myoviridae*

Esta família inclui seis gêneros e 1200 membros (ACKERMANN *et al.*, 1998).

Características: Fagos com cauda contráctil, longa (80-455 x 16-20 nm) e complexa, consistindo de um tubo central envolto por uma bainha contráctil separada da cabeça por um pescoço. Apresentam cápsides relativamente grandes.

Espécie tipo: colifago do grupo T4 (Figura 6).

Morfologia: cabeça alongada de aproximadamente 111 x 78 nm contendo 152 capsômeros. Cauda de 113 x 16 nm, apresentado um colar, placa basal, seis espículas curtas e fibras compridas.

Ácido nucléico: contém uma molécula circular de DNA de fita dupla, com peso molecular de 175×10^6 , correspondendo a 48% do peso da partícula. O conteúdo de G+C é de 35% possui 150-160 genes.

Replicação: adsorção à parede celular, infecção virulenta.

Hospedeiros: enterobactérias

Outros membros: T2, T6, C16, DdVI.

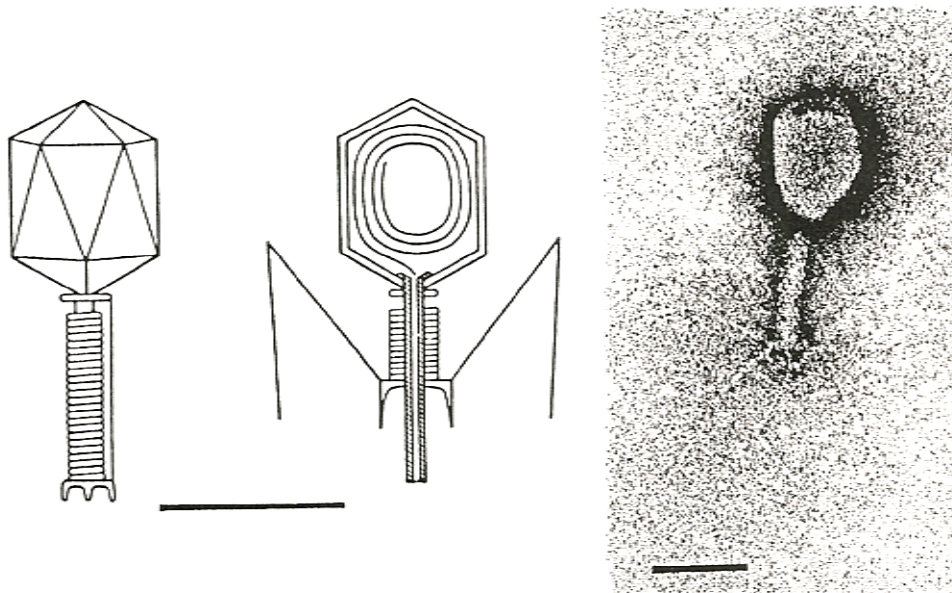


Figura 6- Colifago T4. A barra representa 100 nm.

Fonte: DO VAL, 1997.

2.5.2 *Siphoviridae*

Aproximadamente inclui 2500 membros e cinco gêneros (ACKERMANN *et al.*, 1998).

Características principais: fagos com cauda não contrátil e longa de aproximadamente 65-570x7-10 nm e são frequentemente flexíveis.

Espécie tipo: colifagos do grupo λ (Figura 7).

Morfologia: cabeça isométrica com aproximadamente 60 nm de diâmetro, contém 72 capsômeros. Cauda flexível de 150 x 8 nm com fibras curtas, terminais e subterminais.

Ácido nucléico: consiste de uma molécula de DNA linear de fita dupla com tamanho de 48,5 Kb, correspondendo a 54% do peso da partícula, o conteúdo de G+C é de 52% e o genoma possui aproximadamente 50 genes.

Replicação: adsorção à parede celular, infecção temperada.

Hospedeiros: enterobactérias.

Outros membros: HK97, HK022, ϕ 80.

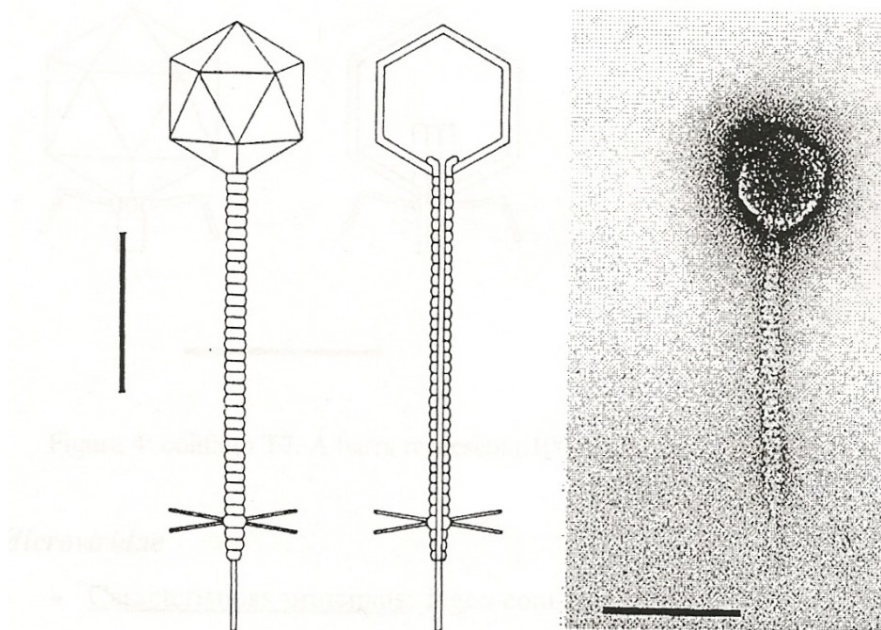


Figura 7- Colifago λ . A Barra representa 100 nm.

Fonte: MURPHY *et al.*, 1995.

2.5.3 *Podoviridae*

Inclue três gêneros e aproximadamente 700 membros (ACKERMANN *et al.*, 1998)

Características principais: fagos com cauda curta de aproximadamente 20 x 8 nm e não contrátil.

Espécie tipo: colifago do grupo T7 (Figura 8).

Morfologia: cabeça isométrica de aproximadamente 60 nm de diâmetro com 72 capsômeros, cauda curta de 17 x 8 nm contendo seis fibras curtas.

Ácido nucléico: consiste de uma molécula de DNA linear de fita dupla com tamanho cerca de 40 Kb, correspondendo a 51% do peso da partícula, o conteúdo de G+C é de 50% , possui cerca de 40-50 genes.

Replicação: adsorção à parede celular, infecção virulenta.

Hospedeiros: enterobactérias

Outros membros: H, PTB, T3, W31.

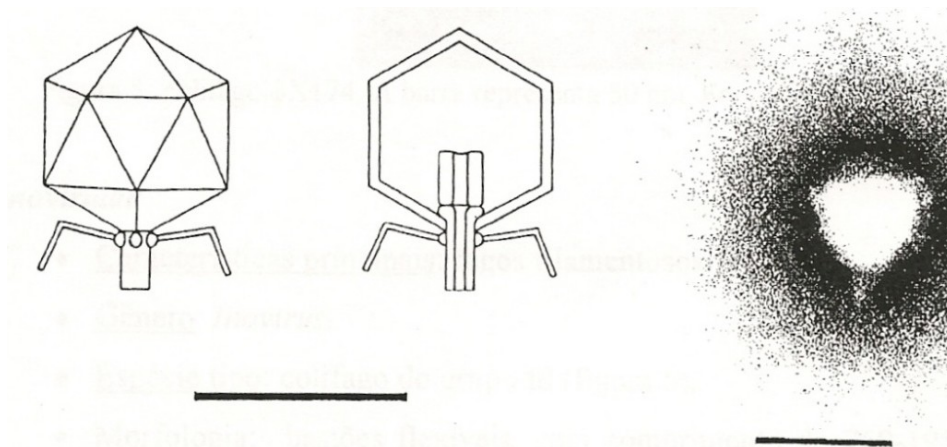


Figura 8- Colifagos T7. A barra representa 100 nm.

Fonte: MURPHY, *et al.*, 1995.

2.5.4 *Microviridae*

Características principais: fagos com cabeça isométrica e DNA de fita simples.

Gênero: *Microvirus*.

Espécie tipo: colifago do grupo ϕ X174 (Figura 9).

Morfologia: icosaédrico, aproximadamente 27 nm de diâmetro, contendo 12 capsômeros e espículas nos vértices.

Ácido nucléico: uma molécula circular de DNA de fita simples positiva com aproximadamente 5,4 Kb, correspondendo a 26% do peso da partícula, o conteúdo G+C é de 44%.

Replicação: adsorção à parede celular, infecção virulenta.

Hospedeiros: enterobactérias.

Outros membros: BE/1, d ϕ 3, d ϕ 4, G4, G6.

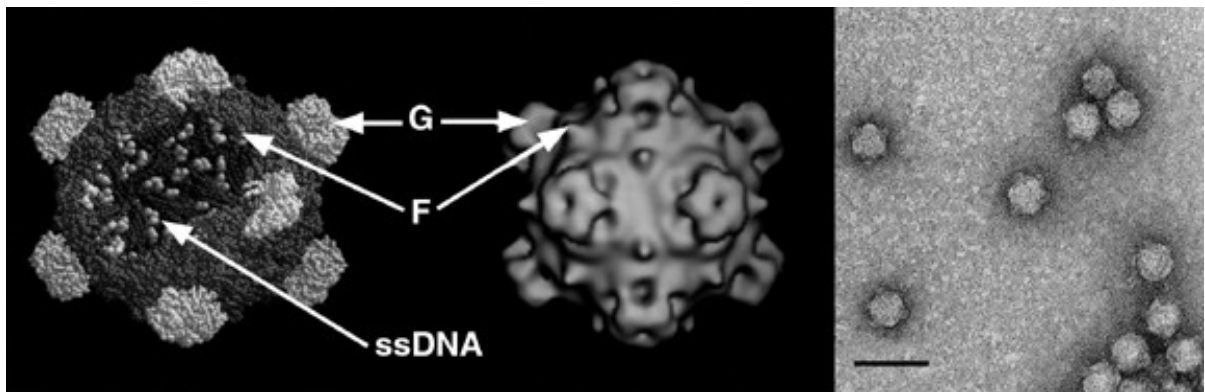


Figura 9- Fago ϕ X174. A barra representa 50 nm.

Fonte: ICTV, 2002.

2.5.5 *Inoviridae*

Características principais: fagos filamentosos.

Gênero: *Inovirus*

Espécie tipo: colifago do grupo fd (Figura 10).

Morfologia: bastões flexíveis com comprimento de 760-1950 x 6-8 nm de diâmetro.

Ácido nucléico: uma molécula de DNA circular de fita simples, sentido positivo. O tamanho do genoma varia de 5,8 Kb a 7,3 Kb, correspondendo a 6-21% do peso da partícula, o conteúdo de G+C é de 40-60%.

Replicação: adsorção ao pili sexual. Infecção virulenta. No entanto, alguns fagos podem ser temperados.

Hospedeiros: enterobactérias, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Xanthomonas*.

Outros membros: C-2, If1, Pf1, Cf, Vf12.

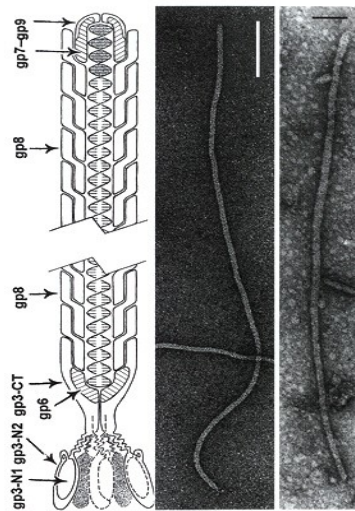


Figura 10- Fago de enterobactérias. A barra representa 100 nm.

Fonte: ICTV, 2002.

2.5.6 *Leviviridae*

Morfologia: icosaédrico com aproximadamente 26 nm de diâmetro, cerca de 32 capsômeros.

Ácido nucléico: uma molécula linear de RNA de fita simples positiva, com tamanho de 3,5 Kb a 4,3 Kb, correspondendo a 31% da partícula, o conteúdo de G+C é de 51-52%.

Replicação: adsorção ao pili sexual. Infecção virulenta.

Hospedeiros: enterobactérias.

Gênero: *Levivirus*.

Espécie tipo: colifagos do grupo MS2 (Figura 11).

Gênero: *Allolevivirus*.

Espécie tipo: colifago do grupo QB.

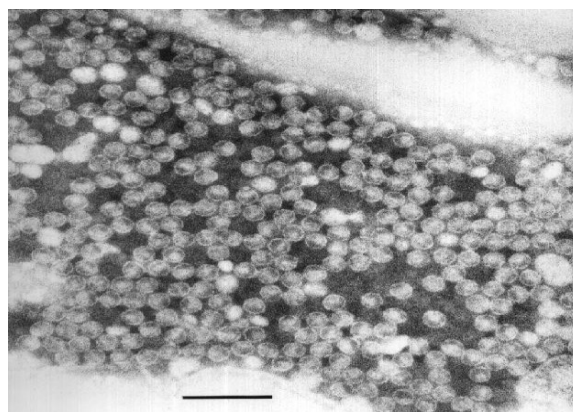


Figura 11- Colifago MS2. A barra representa 100 nm.

Fonte: ICTV, 2002.

Ackermann (1996) fez um levantamento do número de bacteriófagos descritos na literatura e observou que 4500 fagos foram examinados por microscopia eletrônica e pela técnica de coloração negativa. Cerca de 4000 fagos (96%) possuíam cauda e apenas 162 (4%) eram cúbicos, filamentosos ou pleomórficos. Os fagos foram relacionados pelos morfotipos e pelo gênero do hospedeiro. Esse autor observou que os fagos com cauda estavam desigualmente distribuídos nas famílias *Myoviridae* (24,5%), *Siphoviridae* (61,7%) e *Podoviridae* (13,9%) e que apenas 15% dos fagos com cauda apresentavam capsídios alongados.

Pedroso e Martins (1995) estudaram a ultramorfologia de colifagos isolados de amostras de águas do Estado de São Paulo e seus resultados indicaram que os colifagos isolados pertenciam a três famílias de bacteriófagos: *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*. Esses autores utilizaram a *E.coli* C (ATCC 13706) como cepa hospedeira para a detecção dos colifagos e observaram que essa cepa detectava uma grande variedade de colifagos na água.

2.6 Caracterização de bacteriófagos por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A análise do polimorfismo gerada pela clivagem do DNA por enzimas de restrição, denominada (RFLP) foi descrita em 1978 por Kan e Dozy. Esta técnica consiste no estudo e comparação dos perfis obtidos após o uso de enzimas de restrição, endonucleases normalmente compostas de quatro a seis pares de bases que clivam a dupla fita de DNA em seqüências específicas, em regiões denominadas sítios de restrição.

O método apresenta desvantagens quando o DNA é muito grande, pois o polimorfismo apresentado é de difícil visualização e os números de fragmentos gerados podem ser determinados de forma subjetiva, podendo existir fragmentos de tamanhos próximos.

Este tipo de estudo pode ser muito útil quando empregado na análise de DNA de pequenas dimensões ou quando se utilizam enzimas de restrição que produzam poucos fragmentos, de dimensões maiores ou ainda em amostras submetidas a uma hibridização com sondas específicas. Neste último caso os polimorfismos gerados podem ser usados na diferenciação entre os isolados de uma mesma espécie (RIVERA *et al.*, 1995).

Cinco cianófitos marinhos que infectam cepas de *Synechococcus* foram classificados por microscopia eletrônica como pertencentes às famílias *Myoviridae* e *Siphoviridae*. Os autores obtiveram três perfis de restrição diferentes com *EcoRI* e *BamHI* para os cianófitos

isolados e observaram que muitas enzimas utilizadas não clivaram o DNA dos mesmos (WILSON *et al.*, 1993).

A técnica de RFLP foi utilizada em 1993 por Loessner *et al.*, em um estudo de caracterização de fagos de *Enterobacter* isolados de produtos lácticos. Esses autores digeriram o DNA de nove fagos com as enzimas de restrição *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *KpnI* e *ScaI* e observaram que as enzimas *EcoRI* e *EcoRV* clivaram a maioria dos DNAs estudados e produziram um grande número de bandas. No entanto, as enzimas *HindIII* e *BamHI* produziram baixa frequência de clivagem e a enzima *ScaI* não digeriu nenhum DNA. Foram detectados diferentes perfis de restrição entre os bacteriófagos estudados.

Brüssow *et al.* (1994) investigaram bacteriófagos isolados de cepas de *Streptococcus thermophilus* utilizadas na indústria de laticínios. Através da digestão do DNA dos fagos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PvuII* foram observados 46 padrões de restrição diferentes para 81 fagos isolados. Os autores concluíram que a análise por RFLP é útil para a identificação de tipos de fagos em estudos de ecologia, mas não tem valor taxonômico.

2.7 Biologia evolucionária dos fagos

Um vírus depende intimamente da célula hospedeira para se reproduzir, o qual faz à célula hospedeira o ambiente do vírus. As comunidades de vírus têm sido amplamente usadas em testes ecológicos teóricos, devido à sua fácil manipulação, tamanho de população, tempo de geração e pela capacidade de caracterização física e genética (DRAKE *et al.*, 1996; JESSUP *et al.*, 2004; HUNTER-CEVERA *et al.*, 2005).

Existem pelo menos cinco maneiras de considerar a evolução dos fagos: evolução por parentesco, evolução da origem (perspectiva genômica), evolução dos fagos em termos de mecanismos de evolução (por exemplo, o equilíbrio Hardy–Weinberg), ecologia evolucionária e a evolução experimental (ABEDON, 2008).

O início do seqüenciamento de fagos facilitou muito o entendimento dos princípios gerais e das vias evolucionárias (BRÜSSOW *et al.*, 2004; CASJENS, 2005; HENDRIX, 2005; BRÜSSOW e KUTTER, 2005a, 2005b ; BRÜSSOW e DESIERE, 2006).

Os mecanismos de evolução dos fagos, em adição à transferência horizontal, são processos que podem originar mudanças na frequência alélica dentro das populações: mutação, seleção, “*drift*” genético e migração (ABEDON, 2008).

Um modelo de ecologia evolucionaria em fagos é a patogenicidade de *V.cholerae*, que está relacionada à presença de um conjunto de genes de virulência implicados na colonização intestinal e na indução de grave diarreia (MEKALANOS, 1985; TAYLOR *et al.*, 1987).

Em *V.cholerae*, os dois principais fatores associados à virulência são codificados por fagos. Em 1996, Waldor e Mekalanos relataram que os genes que codificam para a toxina colérica (CT) (operon *ctxAB*) eram elementos do genoma do bacteriófago filamentosso CTX ϕ , que infecta *V.cholerae*. A transmissão horizontal do fago CTX ϕ foi demonstrada e depende da presença do fator de colonização TCP, o qual parece atuar como um receptor para o fago CTX ϕ (Figura 12) (KARAOLIS *et al.*, 1998).

Recentemente foram descritas as ilhas de patogenicidade que são agrupamentos de genes de virulência e em *V.cholerae* tem sido descrito duas. Um destes elementos genéticos é o CTX e o outro foi denominado ilha de patogenicidade de *V. cholerae* (VPI) por Karaolis *et al.* (1998) e proposto como um dos fatores genéticos iniciais para a emergência de cólera pandêmica e epidêmica. VPI é uma região de 40 Kb e consiste do agrupamento dos genes associados à virulência TCP e ACF (fator acessório de colonização), regulação da virulência (*toxT* e *tcpPH*) e mobilidade (*int* e *orf1*) estando ausentes em cepas não patogênicas (KARAOLIS e KAPER, 1999).

A transferência via transdução era considerada de pouco valor devido ao efeito lítico da infecção fágica (MILLER *et al.*, 1991). Entretanto, Zeph *et al.* (1988) sugeriram que a transdução é tão importante quanto ou até mais importante que a conjugação e a transformação no ambiente. Neste caso, os vírus podem servir como reservatórios para os genes exógenos.

Estes elementos genéticos movem-se horizontal e verticalmente através das populações bacterianas, conferindo um aumento no “fitness” evolucionário para as células hospedeiras patogênicas. Em alguns casos, estes elementos podem ser transmitidos entre cepas sob condições laboratoriais, mas pouco é conhecido sobre os ambientes naturais que estimulam trocas genéticas entre espécies e clones bacterianos (WALDOR e MEKALANOS, 1996; KARAOLIS e KAPER, 1999).

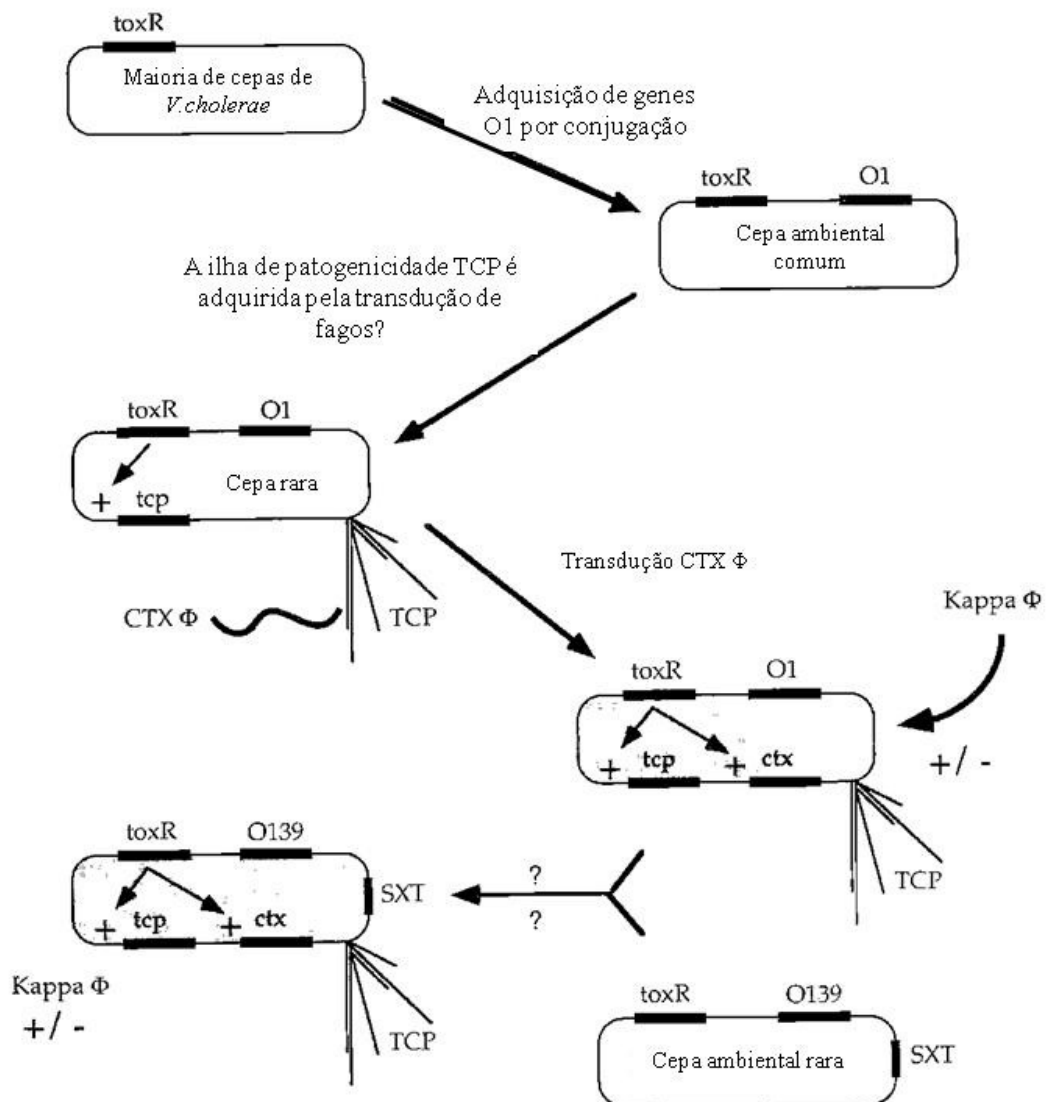


Figura 12- Modelo da transferência genética em *Vibrio cholerae*. Cepas não patogênicas transformam-se em cepas patogênicas pela infecção de fagos filamentosos.

Fonte: CHIANG e MEKALANOS, 1998.

Trabalhos no Brasil enfocando a toxigenicidade de *V. cholerae* têm sido realizados, entretanto, não há estudos sobre a transferência destes genes nestas cepas.

Espeland *et al.* (2004) demonstraram que ao menos três profagos foram observados em *V. cholerae* O1 El Tor e só um profago foi observado na cepa clássica. Estes dados mostram que os biótipos El Tor podem ser polisogênicos e que induções secundárias podem desenvolver indução múltipla de profagos. Estas características podem ser importantes na transferência de material genético entre *V. cholerae* fornecendo um caminho ambiental relevante para a propagação e transmissão de profagos múltiplos.

Evidências tem sido apresentadas mostrando que *ctxAB* pode se integrar dentro do genoma do hospedeiro sem a presença de TCP via transdução de fagos. Isto oferece um mecanismo onde CTX pode replicar-se e integrar-se a alta frequência dentro do cromossomo de cepas não toxigênicas de *V.cholerae* (BOYD e WALDOR, 1999). Devido à importância clínica destes elementos genéticos móveis, a pesquisa atual está focalizada cada vez mais na infecção ambiental de *V.cholerae* por fagos e as condições ambientais que estimulam a troca genética.

Os vírus de bactérias têm um papel muito importante nas funções geoquímicas e ecológicas. Além disso, alguns vírus podem induzir trocas em bactérias por incorporação de segmentos de DNA viral que codificam para proteínas, tanto como toxinas, fatores ou propriedades de sinalização (TAYLOR, 1999). Os vírus agora são conhecidos por ocorrer surpreendentemente em amplas áreas dos oceanos e ter uma influência sob o tamanho e diversidade da população (FUHRMAN, 1999; WOMMACK e COLWELL, 2000), isto é importante para entender as condições ambientais às quais elas respondem e a consequência da resposta.

Normalmente no ambiente aquático é isolado *V.cholerae* não O1, não toxigênico. Em um estudo demonstrou-se que os isolados de *V. cholerae* O1 relacionados à epidemia continham os genes *ctxA* e *zot*, enquanto os isolados pré-epidêmicos não O1 eram negativos (RIVERA *et al.*, 1995). No entanto, apesar de não ser comum a presença de cepas produtoras da toxina colérica, característica da cólera, em cepas ambientais de *V. cholerae* não O1, a produção de outras toxinas foram descritas como citotoxinas e enterotoxinas semelhantes à toxina colérica que poderiam causar diarreia (OHASHI *et al.*, 1972; ZINNAKA e CARPENTER, 1972; KAPER *et al.*, 1979; SAHA *et al.*, 1996).

Quando os fagos temperados causam infecção lisogênica em uma bactéria, agentes mutagênicos como a mitomicina C e a luz Ultravioleta (UV) podem induzir profagos dentro de um ciclo lítico (ACKERMAN e DUBOW, 1987; FARUQUE *et al.*, 1998). Entretanto, pouco é conhecido sobre os fatores que provocam indução do profago, entre os quais poderiam estar incluídos fatores ambientais. (COCHRAN *et al.*, 1998; FARUQUE *et al.*, 1998).

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 para a saúde da população e o desenvolvimento

auto-sustentável. A avaliação de riscos microbiológicos está sendo cada vez mais utilizada 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 de seu consumo, das atividades recreacionais ou pelo contato com aerossóis [FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO, 2003)].

O processo da análise de riscos é constituído por três partes separadas, mas integradas entre si, denominadas avaliação do risco, gerenciamento do risco e a comunicação do risco (Figura 13). O processo da análise de riscos precisa ser aberto e em cada passo todas as partes envolvidas devem participar e discutir (HUSS *et al.*, 2003).

A avaliação do risco fornece a base científica para a análise de riscos [CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION / FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (CFSAN/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 de dose-resposta deve ser feita se dados forem disponíveis, (3) avaliação da exposição, que implica na avaliação quantitativa/qualitativa do grau de entrada ou consumo possa ocorrer, (4) caracterização do risco, onde a integração dos três passos anteriores podem fornecer dados para estimar os efeitos adversos que possam ocorrer numa população.



Figura 13- Componentes genéricos da análise de riscos.

Fonte: adaptado e modificado de MARKMAN, 2009.

A avaliação do risco utiliza modelos quantitativos, que são processos matemáticos utilizados para avaliar as chances de ocorrências dos efeitos adversos depois da exposição a um microrganismo patogênico. O risco é expresso como uma equação matemática da chance de doença ou morte pela exposição a determinados patógenos e representa as probabilidades acumuladas da ocorrência de certos eventos e à incerteza associada a estes (CFSAN/ FDA, 2000).

A 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 numa determinada população exposta. QMRA e estudos epidemiológicos fornecem informações complementares e devem ser utilizados juntos para uma melhor obtenção das estimativas de riscos (POND, 2005). O processo QMRA produz uma estimativa estatística dos efeitos adversos associados à exposição a determinados perigos (HAAS *et al.*, 1999).

O processo da análise de risco normalmente começa com a definição do problema e o seu gerenciamento. Posteriormente, se articulam os objetivos da análise de risco e se identificam questões a serem solucionadas pela avaliação do risco. Durante a fase de avaliação do risco as fases de “mediação” 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 implementação de medidas de redução dos riscos e o monitoramento contínuo da sua eficiência pelos governos, setores privados e outras partes interessadas (FAO/WHO, 2006).

A 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 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 aos antibióticos) e de características do hospedeiro (por exemplo, suscetibilidade fisiológica, estado imune, história prévia de exposição, doenças conjuntas) afeta a caracterização e sua variabilidade associada (FAO/WHO, 2006).

O início de uma caracterização do perigo requer um estágio sistemático de planejamento para identificar o contexto, 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, considerando as características como fatores associados à virulência, resistência aos antibióticos; disseminação por vias secundárias e terciárias; existência de portadores sadios e em alguns casos baixas doses do microrganismo que 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 e o uso de medicamentos, e persistência do organismo na população (FAO/WHO, 2003).

2.9 Caracterização da área de estudo

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 São Sebastião, Santos e Ubatuba no ambiente costeiro do Estado de São Paulo para a realização da coleta de água do mar, plâncton e bivalves. No estado de São Paulo foram escolhidas três áreas de variado grau de poluição antrópica.

2.9.1 Canal de São Sebastião

O Canal de São Sebastião fica localizado no litoral norte do estado de São Paulo entre o município de São Sebastião e a Ilha de São Sebastião. Esse canal tem uma extensão de 25 Km e as entradas possuem configuração afunilada com larguras aproximadas de 7,2 e 5,6 Km, sendo que a parte mais estreita, com aproximadamente 1,9 Km, está localizada na Ponta do Araçá. A profundidade varia entre 20 m nas entradas norte e sul, até uma profundidade máxima de aproximadamente 50 m na parte central do canal, próximo ao Porto de São Sebastião (FURTADO, 1995; SILVA, 2001).

As características termohalinas da água do mar na região do Canal de São Sebastião estão determinadas pela mistura em proporções variáveis da Água Costeira (AC), que apresenta alta temperatura e baixa salinidade ($>20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $32,2\text{-}35,4\text{ }‰$), Água Tropical (AT) com altos valores de temperatura e salinidade ($>20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $>36,4\text{ }‰$), Água Central do Atlântico Sul (ACAS) que contém temperatura e salinidade relativamente baixas ($<20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $<36,4\text{ }‰$), pelo padrão de correntes geradas principalmente pelo vento e as condições climatológicas prevalentes na região (CASTRO FILHO *et al.*, 1987, 1990).

As ondas de marés chegam à costa por leste e sudeste e alcançam as duas entradas do Canal simultaneamente, o que possibilita observar baixas amplitudes de marés no interior do Canal. As correntes não são fortemente afetadas pelas marés, mas são influenciadas pelas condições meteorológicas, pela topografia, e, principalmente, pelos ventos. Os ventos vindos do sul direcionam as correntes para o norte, enquanto que ventos do norte direcionam as correntes para o sudoeste (KVINGE, 1967; CASTRO FILHO, 1990).

A região do Canal de São Sebastião é de grande importância econômica e social, não somente por seus recursos naturais, mas também pela localização de centros urbanos, área de lazer, atividades pesqueiras e por conter um dos mais importantes terminais petrolíferos do país, o Terminal Almirante Barroso (TEBAR). Além do terminal, o Canal de São Sebastião abriga instalações portuárias como o Porto de São Sebastião, o Centro de Biologia Marinha – CEBIMAR/USP e nele ainda desembocam três emissários submarinos que lançam esgotos municipais (MENDES, 2007).

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./Km^2 . 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 (SEADE, 2004)], alterando a rotina

local e a demanda por água, coleta de esgoto e lixo [COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB, 2008)].

2.9.2 Ubatuba – Saco da Ribeira

É uma pequena enseada localizada no trecho sul do município de Ubatuba, litoral norte do estado de São Paulo, onde apresenta grande concentração de estabelecimentos voltados para o turismo e atividade náutica. Graças à sua privilegiada posição geográfica de proteção do embate direto das ondas, é utilizada como marina estadual, concentrando veleiros de várias partes do mundo, além de embarcações pesqueiras. Nessa região encontra-se o único posto de abastecimento de combustíveis flutuante do Litoral Norte e uma base do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (CETESB, 2008).

A região é caracterizada por um regime oligo a mesotrófico, sendo a produtividade primária marinha limitada pela escassez de nutrientes inorgânicos, devido à baixa contribuição terrestre (BRAGA e MULLER, 1998). A produtividade primária da região é dominada por espécies de nanoplâncton, mesmo nas épocas de maiores produtividades, quando *blooms* esporádicos de diatomáceas podem ocorrer (SASSI e KUTNER, 1982).

No verão, a influência dominante na produtividade primária é associada à predominância de ventos paralelos à costa e ao aumento no regime de chuvas e tempestades. A presença da Água Central do Atlântico Sul, uma massa de água fria e rica em nutrientes sobre o domínio interno da plataforma continental (10 a 50 m de profundidade), promove incremento de nutrientes na zona eufótica, ocorrendo *blooms* esporádicos de organismos planctônicos. O aumento da ocorrência de chuvas e tempestades promove maior entrada de matéria suspensa, sedimento e matéria orgânica de origem continental que também contribuem para o aumento da produtividade da região durante os meses de primavera-verão (PIRES-VANIN e MATSSURA, 1993; MAHIQUES, 1995; GAETA *et al.*, 1999).

No outono-inverno, o resfriamento das águas superficiais e uma maior interação da Água Tropical e da Água Costeira tornam as águas próximas à costa quase homogêneas. Nessa época do ano, com o aumento das frentes frias e a homogeneidade da coluna de água, a ressuspensão e regeneração de nutrientes tornam-se os principais fatores responsáveis pela produtividade primária na região (SASSI e KUTNER, 1982).

As atividades econômicas estão voltadas principalmente para o turismo. O município tem grande potencial turístico, não só pelas praias, mas também pelas áreas preservadas da

Mata Atlântica. Com relação ao saneamento básico, tem-se cerca de 22,8% da população atendida pela rede de esgotos (CETESB, 2008).

A população fixa é de 64.778 e a flutuante de 85.616 pessoas, concentradas 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 é de 98 hab./Km² (FUNDAÇÃO SEADE, 2004).

2.9.3 Santos – Baixada Santista

O complexo estuarino de Santos está localizado na porção central do litoral paulista e engloba as Baías de Santos e São Vicente, sendo formado por uma área que abrange 40 km de extensão por 15 km de largura em sua parte mais ampla (CETESB, 2000). É delimitada nas suas extremidades pela Serra de Mongaguá, ao sul e pela parte rochosa da Ilha de Santo Amaro ao norte. Na área central e nordeste, a planície é drenada por uma rede de lacunas e canais de maré que delimitam as ilhas de São Vicente e Santo Amaro (FUKUMOTO, 2003).

A área apresenta um clima litorâneo quente e úmido (ou superúmido), característico do tipo tropical úmido com altos índices de precipitação pluviométrica, sujeita a uma ampla oscilação térmica devido à ação dinâmica da Frente Polar Atlântica, sofrendo ação direta do sistema de brisas e não possuindo estação seca definida. A temperatura média anual é de 22 °C e os totais pluviométricos oscilam entre 2000 mm no litoral e 4500 mm nas encostas [(FUNDAÇÃO DE ESTUDOS E PESQUISAS AQUÁTICAS (FUNDESPA, 1994)].

A circulação de água na baía de Santos e áreas adjacentes é bastante complexa, com contribuições de marés e ventos. As águas oriundas da plataforma continental entram na baía pela face oeste, enquanto que águas mais salobras provenientes do estuário de Santos entram pela face leste. Já a plataforma adjacente, denominada Plataforma Continental Sudeste do Brasil, abriga as massas de Água Costeira, Água Tropical e Água Central do Atlântico Sul (ACAS) (HARARI *et al.*, 1999; BRAGA e NIENCHESKI, 2006).

A Água Costeira ocupa a região mais interna da plataforma e é resultante da mistura da descarga continental de água doce, o que resulta nos menores valores de salinidade da área e altos índices de nutrientes como silicatos, nitrato e fosfato. A água Tropical, situada externamente à Água Costeira e nas camadas superficiais, apresenta valores altos de temperatura (> 20 °C) e salinidade (>36 ‰) e baixas concentrações de nutrientes ao longo do sudeste brasileiro. A Água Central do Atlântico Sul situa-se nas camadas inferiores e é mais expressiva no verão, apresentando baixos índices de temperatura e salinidade e alta

concentração de nutrientes, ocasionando assim, aumentos sazonais da produtividade do ecossistema, quando ocorre a ressurgência dessa massa de água (CASTRO FILHO *et al.*, 2006; BRAGA e NIENCHESKI, 2006).

A Baía de Santos recebe grande aporte de nutrientes através dos canais de São Vicente e de Santos, sendo que o Canal de Santos também é responsável pela dispersão de metais pesados para o sedimento adjacente ao canal até a Ilha da Moela, devido ao transporte executado pelas embarcações que fazem a dragagem do canal (ARGENTINO-SANTOS, 2006).

Santos, está entre os dez municípios mais populosos do Estado de São Paulo, com cerca de 417.000 habitantes e taxa de crescimento 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, e com o crescimento desta, esses canais acabaram se transformando na principal fonte de poluição fecal das praias, em decorrência de inúmeras ligações irregulares de esgoto a eles (CETESB, 2008).

Atualmente, as principais fontes de contaminação no Estuário de Santos e São Vicente são o Porto de Santos, o Pólo Industrial de Cubatão, os lixões, os despejos de esgoto que ocorrem de forma clandestina (MEDEIROS, 2000; MARTINS, 2005) e o emissário de Santos, que possui apenas quatro quilômetros de extensão e despeja, dentro da baía, o esgoto doméstico proveniente da cidade de Santos, o qual é responsável pela emissão de alta carga de nutrientes, surfactantes e metais pesados (ABESSA *et al.*, 2005; MARTINS, 2005).

3 JUSTIFICATIVA

Os indicadores atuais da qualidade da água e de seu tratamento, tais como coliformes, coliformes termotolerantes e enterococos intestinais, indicam apenas a presença de poluição fecal e risco indireto à saúde. A APHA recomenda a contagem de colifagos para avaliar a qualidade microbiológica da água, devido ao fato dos colifagos somáticos serem mais prevalentes que os colifagos F-específicos e, terem uma maior resistência frente às altas radiações solares.

A contaminação da água é um dos maiores problemas da saúde pública, principalmente em áreas tropicais e subtropicais onde diversidade e severidade das doenças veiculadas por águas contaminadas é maior. No mundo inteiro mais de 250 milhões de novos casos de doenças de veiculação hídrica são relatados a cada ano, resultando em mais de 10 milhões de mortes. Cerca de 75% dessas doenças ocorrem em áreas tropicais e subtropicais e cerca de 50% das mortes por doenças diarréicas (4,6 milhões) acontecem em crianças com menos de 5 anos que vivem nos trópicos.

No ambiente marinho, a distribuição dos microrganismos depende das correntes marinhas, das marés e principalmente das atividades humanas. A rota principal de exposição ao homem ocorre pela ingestão de alimentos marinhos, entretanto, doenças infecciosas também podem ocorrer por contato durante o uso recreacional ou proveniente das atividades ocupacionais. Os moluscos bivalves incluídos também neste estudo são considerados como sentinelas no ambiente marinho, uma vez que possuem a capacidade de filtrar até quatro litros de água por hora para ingerir plâncton, permitindo a acumulação no seu conteúdo valvar de todos os contaminantes biológicos e químicos dispersos no ecossistema. A densidade de microrganismos nos bivalves reflete a qualidade microbiológica da água onde são cultivadas e por essa razão foram utilizados como comparação na contagem de colifagos somáticos nos diferentes ecossistemas estudados.

Estudos sobre a diversidade de colifagos somáticos em ambientes aquáticos são importantes para avaliar o uso potencial destes vírus como indicadores da presença de bactérias patogênicas e de vírus entéricos na água. Nos últimos anos, devido à expansão das atividades antrópicas na região costeira marinha, tornou-se imperativa a necessidade de uma avaliação contínua da qualidade das águas litorâneas, afetando a saúde do ecossistema marinho de duas formas: (1) poluição microbiana pela introdução de microrganismos patogênicos levados pelo homem e (2) os poluentes químicos orgânicos e inorgânicos, que

dependendo do tipo, podem afetar severamente as estruturas das comunidades dos ecossistemas.

3.1 Objetivo Geral

Quantificar, caracterizar e relacionar a diversidade de colifagos somáticos em ecossistemas aquáticos marinhos com diferente grau de poluição antrópica.

3.2 Objetivos específicos

Caracterizar a qualidade microbiológica da água do mar das regiões de São Sebastião, Santos e Ubatuba através de indicadores de contaminação fecal.

Determinar as concentrações de colifagos somáticos nas amostras de água do mar, plâncton e bivalves.

Observar a relação dos colifagos somáticos com os indicadores de poluição fecal e com os parâmetros físico-químicos determinados nas regiões estudadas.

Determinar a diversidade de colifagos somáticos pela microscopia eletrônica, pela análise de DNA por enzimas de restrição e pelo rep-PCR.

Pesquisar a presença de *V.cholerae* O1 toxigênico como modelo de microrganismo patogênico.

Verificar a presença dos genes da toxina colérica (*ctxA*), da toxina correguladora do pilus (*tcpA*), toxina termolábil (*lt*) e toxina termoestável (*st*) nos colifagos somáticos isolados e quando presentes analisá-los por seqüenciamento.

Obter dados científicos para subsidiar o 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 Amostragem

Amostras de água do mar, plâncton e bivalves foram coletadas no litoral do estado de São Paulo.

4.1.1 Locais de estudo, período e pontos de coleta

4.1.1.1 Canal de São Sebastião

As amostras foram coletadas mensalmente, no período de agosto de 2005 a março de 2007, em dois pontos: (i) Ponto 1, em frente à Praia do Segredo (Latitude $23^{\circ} 49' 50''$ S / Longitude $45^{\circ} 25' 20''$ W), (ii) Ponto 2, na região norte da Praia de Barequeçaba (Latitude $23^{\circ} 49' 56''$ S / Longitude $45^{\circ} 25' 51''$ W) (Figura 14).

4.1.1.2 Baía de Santos

A coleta de amostras foi realizada nos meses de fevereiro a maio de 2006 e janeiro a março de 2007 em três pontos de coleta: (i) Ponto 1 – entrada da cidade de São Vicente (Latitude $23^{\circ} 38' 57''$ S / Longitude $46^{\circ} 37' 10''$ W), (ii) Ponto 2 – Boca da Barra, depois da Ilha das Palmas (Latitude $24^{\circ} 02' 25''$ S / Longitude $46^{\circ} 33' 23''$ W) e (iii) Ponto 3 – próximo à Marina Astúrias (Latitude $23^{\circ} 59' 57''$ S / Longitude $46^{\circ} 18' 39''$ W) (Figura 14).



Figura 14- Localização dos pontos de coleta de amostras em Ubatuba, São Sebastião e Santos.
Fonte: Google Earth, adaptado por Almeida, B.

4.1.1.3 Ubatuba

Foram selecionados dois pontos de coleta: (i) Ponto 1 – (latitude 23° 30' 02"S / Longitude 45° 07' 07") e (ii) Ponto 2 - (Latitude 23° 30' 41" / Longitude 45° 06' 04") (Figura 14). As coletas ocorreram mensalmente durante os meses de fevereiro a maio de 2006 e janeiro a março de 2007.

4.1.2 Coleta de amostras de água do mar

Foram coletados 5 litros de água do mar, em cada ponto, em frascos de polipropileno previamente esterilizados, a 10 cm da superfície.

4.1.3 Coleta de amostras de plâncton

As amostras de plâncton foram coletadas por arraste horizontal com rede de malha de 64 µm por um período de 5 minutos. O material retido na rede foi colocado em frascos plásticos de 250 mL previamente esterilizados.

4.1.4 Coleta de bivalves

Cerca de 20 a 30 exemplares de bivalves foram coletados na área costeira do entorno da área de coleta das amostras de água.

Todos os três tipos de amostras, dos três locais estudados foram transportados sob refrigeração, para o Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular/ICB II/USP e analisados no prazo máximo de 24 horas.

4.2 Metodologia

4.2.1 Determinação dos parâmetros físico-químicos

No momento da coleta, foram determinados os parâmetros de salinidade, temperatura, condutividade e pH das amostras de água do mar, utilizando um equipamento de multi-parâmetros HACH CO150 (Hach Company). Alternativamente, em São Sebastião valores

mensais de monitoramento foram obtidos da estação CEBIMar-USP (Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo).

4.2.2 Análises microbiológicas

4.2.2.1 Contagem de bactérias marinhas viáveis (BMV)

As BMV foram quantificadas através da inoculação em superfície de 0,01 mL e 0,1 mL da amostra de água do mar numa placa de petri contendo o meio ágar marinho (2216, Difco). As placas foram incubadas a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por um período de 24- 48 horas. Após o período de incubação, foi efetuada a contagem das colônias e expressado o resultado em UFC/100 mL.

4.2.2.2 Contagem de coliformes termotolerantes (CT) e *E.coli*

Foi realizada de acordo com metodologia proposta pela APHA, 1998 (protocolo 9222E e 9225C).

4.4.2.3 Contagem de enterococos intestinais (EI)

A contagem de enterococos intestinais foi realizada através do método de membrana filtrante 1106.1 recomendado pela “Environmental Protection Agency” (EPA ,2000). Cinco colônias foram selecionadas para a confirmação bioquímica (crescimento em Ágar Bile Esculina [Difco] a 35 °C por 48 horas, crescimento em caldo infusão cérebro coração - BHI – [Difco] a $45\text{ °C}/48$ horas e crescimento em caldo BHI com cloreto de sódio 6,5% a $35\text{ °C}/48$ horas). Após o reajuste do número de colônias, o resultado das contagens em ágar mE foi expresso em UFC/100 mL.

4.2.2.4 Contagem de Vibrios

A contagem de vibrios em amostras de água foi realizada pelo método de semeadura em superfície (*Spread Plate*) e pela técnica de membrana filtrante, com alíquotas de 1 mL e 20 mL de amostra respectivamente, utilizando o meio de cultura ágar Simidu. As placas foram incubadas a 20 °C por 24 horas.

4.2.2.5 Determinação de vibriófagos

Foi realizada a contagem de vibriófagos em amostras de água do mar, plâncton e bivalves de acordo com a metodologia baseada na norma da CETESB L5-223, método quantitativo para a detecção de fagos F-específicos. As cepas hospedeiras usadas neste estudo foram: *V.cholerae* O1 ElTor e as cepas de *V.cholerae* O1 RC25 e RC28, espécies pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular.

Nesta metodologia, alternativamente foram testados também os meios de cultura LB (Luria Bertani) e APA (água peptonada alcalina) em lugar do meio com extrato de levedura e glicose.

4.2.2.6 Detecção de colifagos

4.2.2.6.1 Preparo da cultura estoque da cepa hospedeira

O preparo da cepa hospedeira *Escherichia coli* C (ATCC 13706) foi realizado usando a metodologia recomendada pela APHA, 1998. A suspensão bacteriana foi dividida em tubos criogênicos estéreis (4,5 mL), colocados em banho de gelo por 10 minutos e estocadas a -20 °C por um período máximo de seis semanas.

4.2.2.6.2 Processamento das amostras para o ensaio de detecção de colifagos

4.2.2.6.2.1 Amostras de água do mar

As amostras de água do mar foram submetidas à centrifugação de 3000g por 30 minutos. O sobrenadante foi usado para a quantificação de colifagos somáticos (APHA, 1998).

4.2.2.6.2.2 Amostras de plâncton

As amostras de plâncton foram concentradas através de uma peneira com malha de 64 µm, um grama de cada amostra foi macerado com um homogeneizador de tecidos e foram feitas diluições em solução salina 0,85% na proporção 1:10 e 1:100, as mesmas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram usados para a análise.

4.2.2.6.2.3 Amostras de bivalves

Vinte e cinco gramas de bivalves foram misturados em 225 mL de solução salina 0,85%, para obter uma diluição 1:10, as amostras foram homogeneizadas em stomacher (Lab Blender), centrifugadas e o sobrenadante usado para a detecção de colifagos somáticos.

4.2.2.6.3 Leitura e expressão de resultados

As placas de lise formadas no ágar foram contadas com auxílio de um contador de colônias (Quebec) e as características das placas de lise observadas foram registradas. O resultado para água do mar foi expresso como Unidades Formadoras de Placas por 100 mL (UFP/100 mL) e para plâncton e bivalves expresso como Unidades Formadoras de Placas por grama (UFP/g).

4.2.2.6.4 Isolamento das placas de lise

De cada tipo de amostra foram selecionadas as placas que apresentaram características morfológicas diferentes. Cada placa de lise foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de caldo de soja e tripton e 1,0 mL da cultura bacteriana hospedeira *E.coli* ATCC 13076, previamente crescida por 2 horas, sob agitação, a 35 °C. O tubo foi incubado a 37 °C por 3 horas e então centrifugado a 3000 rpm (Eppendorf 5403) por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de filtro de membrana de nitrocelulose (Millipore) 0,22 µm e diâmetro de 25 mm. A suspensão de fagos foi titulada e estocada a 4 °C protegida da luz para posterior caracterização.

4.2.2.6.5 Titulação dos colifagos isolados

A partir das suspensões de fagos isolados foram feitas diluições sucessivas em solução salina 0,85% para a verificação do título dos mesmos. A um tubo contendo 5,5 mL de TSA modificado foi acrescentado 1,0 mL da cultura hospedeira, 4,0 mL de solução salina 0,85% estéril e 1,0 mL da diluição a ser quantificada. A mistura foi vertida em uma placa de Petri estéril, homogeneizada e incubada a 35 °C de 6 horas até 24 de incubação. As contagens do número de placas de lise foram feitas após 24 horas de incubação.

4.2.2.7 Pesquisa de *Vibrio cholerae* pela técnica de enriquecimento

Um litro de cada amostra de água do mar foi concentrado pela técnica da membrana filtrante de nitrocelulose 0,22 mm (Millipore). A membrana foi inoculada em 25 mL de Água Peptonada Alcalina (APA) e mantida a temperatura ambiente (28 a 30 °C), a cada 6, 12 e 18 horas, uma alçada do crescimento foi semeada em placas contendo ágar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Sais biliares e Sacarose) (Difco) em duplicata, e após incubação (28-30 °C por 24 horas) isolou-se as colônias amarelas características de *V. cholerae* e posteriormente foram armazenadas em ágar APA inclinado para posterior caracterização. Os caldos APAs com crescimento foram mantidos a -20 °C em tubos de 50 mL (Falcon) para posterior detecção de *V. cholerae* através de testes moleculares.

Todas as colônias características de *V. cholerae* foram submetidas a uma triagem básica usando as provas de oxidase e teste da corda (string test/desoxicolato de sódio 0,5%). Posteriormente, foram feitas as reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para confirmação da espécie e detecção dos genes associados à virulência (toxina colérica (*ctxA*) e a toxina correguladora do pilus (*tcpA*)). Os caldos APAs com crescimento também foram submetidos à PCR apenas para detecção de *V. cholerae*.

4.2.3 Análises moleculares

4.2.3.1 Extração de DNA cromossomal bacteriano

A extração de DNA foi realizada usando a metodologia de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) proposta por Rivera *et al.* (2003). A pureza e concentração dos DNAs obtidos se determinaram a uma razão 260nm/280nm por espectrofotometria (Nanodrop ND 1000) (SAMBROOK *et al.*, 1989). A qualidade de DNA foi observada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) preparado em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8), corado com uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), corrido a 90 V durante uma hora e fotografado sob luz ultravioleta. Como marcador de tamanho molecular foi usado o DNA do fago Lambda *Hind*III (Promega). O DNA foi armazenado a 4 °C e protegido da luz com papel alumínio.

4.2.3.2 PCR para identificação de *V. cholerae* e multiplex PCR para a determinação da presença dos genes relacionados à virulência *ctxA/tcpA*

Para *V. cholerae* foi usada a técnica molecular de PCR “*Polymerase Chain Reaction*” com os iniciadores PVC-F2 (5'- TTA AGC STT TTC RCT GAG AAT G-3') e PVC m-R1 (5'-AGT CAC TTA ACC ATA CAA CCC G-3'), específicos para regiões 16S-23S rDNA de espaços intergênicos de *V. cholerae* (CHUN *et al.*, 1999). Para determinação da presença de CTX e TCP foram seguidas as condições recomendadas por Rivera *et al.*, 2001 (Tabela 4, p. 71.). O termociclador utilizado para ambos os procedimentos foi o modelo EP gradiente S (Eppendorf).

4.2.3.3 Caracterização molecular para bactérias presuntivas de *V. cholerae* pelas técnicas de ERIC-PCR “*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences*” e BOX-PCR “*BOX-AIR-based repetitive extragenic palindromic*”

O DNA de cada isolado bacteriano foi submetido à técnica de BOX-PCR, usando o primer BOX A1 (5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3') (VERSALOVIC *et al.* (1991), e ERIC-PCR utilizando apenas o iniciador ERIC 2 (5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3') (RIVERA *et al.*, 2003).

As reações de BOX e ERIC-PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL, sendo 5 µL de solução tampão 10X (com MgCl₂ a 1.5 mM) (*Colorless Go Taq™ Reaction Buffer* – Promega), 2,0 µL de solução *mix* de dNTPs a 2,5 mM (Promega), 2 µL do iniciador (BOX A1 ou ERIC2) a 20 µM (IDT - Integrated DNA Technologies), 0,125 µL da enzima GoTaq® DNA Polimerase (Promega), 14,88 µL de água milli-Q e 1 µL de DNA padronizado a 100 ng/µL. Foram utilizadas as cepas padrão RC11 (*V. cholerae* O1), RC230 (*V. cholerae* O1 Inaba), RC231 (*V. cholerae* O1 Inaba) e 569B (*V. cholerae* O1), como controles positivos e água milli-Q, em substituição ao DNA, como controle negativo em todas as reações realizadas.

Após a amplificação, 15 µL da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 1,0% (p/v), em tampão TAE 1X a 70 V por 90 minutos. Em cada gel, o DNA digerido do fago Lambda *HindIII* (Promega) foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 10 minutos e fotografado no sistema de fotodocumentação Chemidoc™ XRS System (Bio-Rad).

4.2.3.4 Técnica de seqüenciamento para bactérias

A PCR para 16S rDNA foi realizada utilizando os iniciadores 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') e 1041R (5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3'), descritos por Lane (1991) para identificação de bactérias. O preparo da reação para 16S-PCR foi feita em volume final de 50 µL, sendo 5 µL de solução tampão 10X (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ a 50mM (Invitrogen), 0,2 µL de solução *mix* de dNTPs a 2,0mM (Invitrogen), 1 µL da solução de cada oligonucleotídeo a 20 µM (Invitrogen), 0,4 µL da enzima *Taq* polimerase, 39,90 µL de água milli-Q e 1 µL de DNA (50 ng). As reações de 16S-PCR para amplificação foram realizadas segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguindo-se 30 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 55 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 3 minutos e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos em termociclador (Mastercycler ep Gradient S – Eppendorf). Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal a 80 V por 1 hora em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X.

Os produtos das reações de 16S foram purificados utilizando o Ilustra “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit” (28-9034-70, GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foram submetidos à reação de seqüenciamento com o iniciador 1041R (5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3') abrangendo regiões do gene 16S rRNA. As reações de seqüenciamento foram realizadas com 3-5 µL (50 ng) do produto, seguindo o protocolo do kit *DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* para MegaBace™ (US81090, GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Os produtos foram seqüenciados no Instituto Genoma Humano da Universidade de São Paulo no seqüenciador automático *MegaBace 1000 DNA Analysis System* (Amersham Biosciences) com as seguintes condições: 95 °C por 20 segundos, 50-55 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os ciclos foram repetidos por 30 vezes.

4.2.3.5 Indução de profagos em *V.cholerae* (MILLER, 1998)

A indução de profagos de *Vibrio* foi acompanhada pelo tratamento dos lisogenos com luz ultravioleta e mitomicina C, seguindo a metodologia proposta por Miller (1998). Para este teste foram usadas 11 cepas ambientais e 8 clínicas de *V.cholerae* O1 ctx+ (gene *ctxA* que codifica para a toxina colérica) pertencentes à coleção de culturas RC do Laboratório de ecologia microbiana molecular. Para garantir a estabilidade das características genéticas foi

feito um banco de células conservadas em duas concentrações finais de glicerol (30% e 20%). A viabilidade celular foi verificada a cada dois meses durante um ano, seguindo o modelo estatístico ($0.4\sqrt{n}$) descrito por Meza e Monroy (2002).

4.2.3.5.1 Procedimento de indução com luz ultravioleta (UV)

As culturas foram incubadas em 15 mL de caldo Lúria, a temperatura de 30 °C até atingir a fase exponencial. A cultura foi centrifugada e o pellet lavado duas vezes com solução salina 0.85%. As células foram suspensas em solução salina e colocadas em uma placa de petri estéril para serem expostas à radiação UV com uma intensidade de 15,86 J/m². Os tempos de exposição à luz ultravioleta foram: 10 seg, 15 seg, 30 seg, 1 min, 5 min, 10 min e 15 min. Posteriormente, de cada experimento retirou-se 1 mL da suspensão contida na placa de petri e adicionou a um tubo contendo 4 mL de meio de cultura LB. A mistura foi incubada por 4 horas em escuridão a temperatura ambiente (28 °C a 30 °C) em shaker horizontal. Sempre foi colocado um controle de cada bactéria não induzida, para calcular os níveis não induzíveis de virions nas suspensões que foram expostas.

Depois deste período de expressão, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado em tubos eppendorf estéreis cobertos com papel alumínio. Este lisado foi titulado, filtrado e armazenado a 4 °C.

4.2.3.5.2 Procedimento de indução com mitomicina C

As culturas foram inoculadas em 5 mL de meio LB e incubadas a 30 °C até atingir a fase exponencial. A cultura foi dividida alíquotando 1 mL em tubos cobertos com papel alumínio. Cada alíquota foi adicionada de uma solução de mitomicina C com diferentes concentrações (0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL). Usou-se um tubo controle contendo a cepa em crescimento exponencial sem mitomicina C. As culturas foram incubadas a temperatura ambiente (28 °C a 30 °C) por 2 a 3 horas na escuridão. Depois da incubação, os lisados foram centrifugados e seus sobrenadantes removidos. Os lisados foram titulados, filtrados e armazenados a 4 °C.

4.2.3.6 Caracterização de colifagos somáticos

4.2.3.6.1 Caracterização por microscopia eletrônica

A concentração dos sobrenadantes dos colifagos para microscopia eletrônica sempre foi verificada com antecedência, procurando atingir um título de 10^8 ou 10^9 UFP/mL.

A morfologia dos fagos foi observada pela técnica de coloração negativa (BRENNER e HORNE, 1959). A adesão das partículas virais foi efetuada em grades de cobre de 300 "mesh" (unidade de medida da malha) recobertas com formvar e carvão. A grade foi colocada em contato com 50 μ L da amostra ressuspensa em fosfotungstato de potássio a 2%, pH 6,4, por 10 minutos e o excesso foi retirado da grade com papel de filtro. Após secagem, a grade foi examinada em um microscópio eletrônico JEOL EM1011 60V da Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. As amostras foram fotografadas em um aumento de 150.000X utilizando câmara digital. Foram realizadas, em média, medições de cinco partículas fágicas para cada amostra examinada. As medidas dos fagos foram feitas em fotografias impressas em papel de alta resolução com ajuda de um paquímetro.

4.2.3.6.2 Caracterização molecular de colifagos

4.2.3.6.2.1 Extração do ácido nucléico

4.2.3.6.2.1.1 Protocolo A. Modificação da técnica de Sambrook *et al.*, 1989

Inicialmente, em fase experimental, o DNA dos fagos foi extraído utilizando a técnica proposta por Sambrook *et al* (1989). A extração de DNA foi realizada em triplicata partindo de suspensões de fagos com títulos aproximados de 10^6 a 10^8 UFP/mL. A um volume de 600 μ L da suspensão de fagos foram adicionados 0,2 volumes do tampão de lise STEP (SDS 0.5%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,4 M e Proteinase K 1 mg/mL), e a suspensão foi homogeneizada e incubada a 50 °C por 20 minutos em banho-maria. Um volume igual de fenol saturado com Tris-HCl pH 8,0 10 mM e 1 mM de EDTA foi adicionado à suspensão, homogeneizada e centrifugada a 8000 rpm por 10 minutos a 4 °C (Eppendorf modelo 5403).

A fase aquosa foi transferida para um tubo eppendorf estéril e purificada com igual volume da mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) saturado com 10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA. O tubo foi homogeneizado e centrifugado a 8000 rpm por 10

minutos a 4 °C. A fase aquosa foi removida para um tubo de eppendorf estéril e purificada com um volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e então centrifugada a 8000 rpm por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de eppendorf estéril e o DNA precipitado com 2 volumes de etanol a 95% mantido a -20 °C. Essa solução foi incubada a -20 °C "overnight" e então centrifugada a 10000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi colocado na estufa a 47 °C por 10 minutos. O DNA foi suspenso em uma solução de TE (Tris-EDTA, pH 8,0) e estocado a 4 °C protegido da luz.

4.2.3.6.2.1.2 Protocolo B. Modificação da técnica de Lockett (1990)

A extração de DNA foi realizada em triplicata, partindo de suspensões de fagos com títulos aproximados de 10^8 UFP/mL. A um volume de 1000 μ L da suspensão de fagos foram adicionados 5 μ L de RNase (20 mg/mL) e 5 μ L de DNase (1 u/ μ L), e a suspensão foi homogeneizada e incubada a 37 °C por 30 minutos em banho-maria. Posteriormente, foi adicionado 20 μ L de uma solução filtrada de ZnCl₂ 2,0 M, a solução foi homogeneizada e incubada por 5 minutos a 37 °C. Depois desta etapa, a solução foi centrifugada a 8000 rpm por 5 minutos a 20 °C em Centrífuga Eppendorf modelo 5403.

A fase aquosa foi descartada e o pellet foi ressuspendido em 500 μ L de tampão TES (0,1 M de Tris-HCl pH=8,0, 0,1 M de EDTA e 0.3% de SDS), a solução foi incubada por 15 minutos a 65 °C, e posteriormente, foi adicionado 60 μ L de acetato de potássio 3M pH 4. A mistura foi homogeneizada com vortex e incubada em gelo por 15 minutos. A solução foi centrifugada por 1 minuto a 8000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf estéril e foi adicionado igual volume de álcool isopropílico para precipitação do ácido nucléico. O ácido nucléico foi lavado com 200 μ L de álcool etílico e deixado por 15 minutos a 47 °C para secar. O DNA foi ressuspendido em uma solução de TE (Tris-EDTA, pH 8,0) e estocado a 4 °C protegido da luz.

Em ambos os métodos, a concentração e pureza do DNA de cada amostra foram determinadas através de eletroforese e por espectrofotometria (Nanodrop ND 1000).

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Tris acetato EDTA). Foi utilizado como marcador de peso molecular e concentração de DNA o fago Lambda DNA – *Hind*III (Promega). A corrida eletroforética foi realizada em uma corrente elétrica contínua de 55 volts por aproximadamente 3 horas. Logo após a corrida o gel foi

corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 10 minutos e visualizado em um fotodocumentador Chemidoc™ XRS System (Bio-Rad).

4.2.3.6.2.2 Caracterização do tipo de material genético do fago DNA/RNA

O tipo de material genético do colifago foi identificado através da incubação com *DNaseI* ou *RNaseA* (Promega). As amostras contendo 200 ng de material genético extraído conforme o protocolo B foram incubadas com 1U da enzima por 30 minutos a 37 °C. A enzima foi inativada por calor a 65 °C e as amostras foram observadas em gel de agarose 1% e utilizando como marcadores de peso molecular o λ Lambda *HindIII* (Promega) e o marcador de 1 Kb (Promega).

4.2.3.6.2.3 Caracterização do DNA dos colifagos utilizando enzimas de restrição

Concentrações de 200 ng/µL de DNA foram submetidas à digestão pelas enzimas de restrição *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *HaeIII*, *BamHI*, *BglII*, *RsaI*, *HinfI* e *DraI* (Promega) e incubadas em banho maria a 37 °C por 3 horas para a primeira enzima e duas horas para as outras (SAMBROOK *et al.*, 1989). O produto obtido foi revelado através de eletroforese em gel de agarose 1 %, sendo a corrida realizada com uma voltagem de 50 V por, aproximadamente, 3 horas. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por dez minutos.

4.2.3.6.2.4 Detecção de genes associados à virulência em colifagos

Foram pesquisados os seguintes genes associados à virulência: *ctxA* (toxina colérica--CT), *tcpA* (toxina co-regulatória do pilus-TCP), *lt* (toxina termo lábil-LT) e *st* (toxina termo estável-ST). Os iniciadores (*primers*) usados e os programas estão descritos na tabela 4.

Tabela 4- Primers e condições de PCR para a detecção de genes associados à virulência em colifagos somáticos.

Primers	Seqüência	Ciclos de amplificação	Gene Amplicon (pb)	Referência
94F	5'- CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G-3'		Gene <i>ctxA</i> (564)	FIELDS <i>et al.</i> , 1992
614R	5'- CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC-3'	94°C-2'/30 ciclos		
72F	5' CAC GAT AAG AAA ACC GGT CAA GAG 3'	{94°C-1'/60°C-1'/72°C-1'}/72°C-10'	Gene <i>tcpA</i> El Tor (451)	RIVERA <i>et al.</i> , 2001
477R	5' CGA AAG CAC CTT CTT TCA CGT TG 3'			
LTf	5' GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC 3'		Gene <i>LT</i> (450)	
LTr	5' CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT 3'	95°C-5'/40 ciclos		ARANDA <i>et al.</i> , 2004
STf	5' ATT TTT MIT TCT GTA TTR TCT T 3'	{95°C-40''/58°C-1'/72°C-2'}/72°C-7'	Gene <i>ST</i> (190pb)	
STr	5' CAC CCG GTA CAR GCA GGA TT 3'			

4.2.3.6.2.5 Seqüenciamento dos genes associados à virulência

Foi realizada uma PCR para detecção de LT e ST com os *primers* LTf, LTr, STf e STr de forma separada com as mesmas condições de amplificação mostradas na tabela 4. Os produtos de PCR foram purificados usando o “Ilustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit” (28-9034-70, GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Os produtos purificados depois de serem quantificados por espectrofotometria (nanodrop ND 1000) foram submetidos a uma reação de PCR com cada um dos primers num volume final de 20 µL (8 µL de água miliq, 4 µL de tampão 5X, 2 µL do primer a uma concentração de 1,6 µM, 4 µL BD “*Big Dye*”, e 2 µL da amostra padronizada a 20 ng). Foi usado como controle interno da reação o pGEM com o primer M13. O programa do termociclador foi de 25 ciclos a uma temperatura de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Finalmente 10 minutos a temperatura de 4 °C.

A reação de PCR para seqüenciamento foi purificada usando 50 µL de etanol absoluto e 2 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 para cada 20 µL de amostra. A mistura foi homogeneizada com vortex, deixada em incubação por 15 minutos em escuridão e centrifugada por 20 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, com muito cuidado foi descartado o sobrenadante e adicionado 300 µL de etanol a 70%, homogeneizou-se por inversão uma só vez, centrifugou-se a 13.000 rpm e se descartou o sobrenadante. Os tubos foram secos em bloco a 60 °C por 2 minutos, levados ao freezer por 2

horas e finalmente ressuspendidos em 5 μ L de EDTA/ “loading” diluído em formamida para seqüenciamento no seqüenciador ABI 377. As amostras foram seqüenciadas no laboratório de Biologia Molecular da Seção de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

4.3 Análise dos resultados

4.3.1 Análise estatística

Quando as variáveis foram paramétricas, estas foram descritas na forma de média e desvio padrão dos resultados e realizado o teste de análise de variância para médias não repetidas. Quando as variáveis eram paramétricas foram descritas como media e desvio padrão da amostra e realizado teste de análise de variância para médias não repetidas com pós-teste de Diferença Mínima Significante (LSD) ou pós-teste de *Tukey* modificado para comparação entre os diferentes grupos. Quando as variáveis eram não paramétricas foram descritas na forma de mediana e percentis 25 e 75 utilizando o teste de *Kruskal-Wallis*, 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 1.

A correlação *Spearman* foi usada para testar a relação entre os indicadores bacterianos e colifagos com $p \leq 0,05$ e r entre 0 e 1. A variável dependente (colifagos) foi tratada como uma variável binária, ou seja, uma pontuação de 1 foi atribuída quando os colifagos foram detectados. As variáveis independentes foram contínuas, e os valores para as amostras em que os organismos não foram detectados foram relatados como zero. Os dados foram representados utilizando as caixas boxplot pelo método *Tukeys Hinges*.

Os dados obtidos de viabilidade celular de *V.cholerae* foram analisados usando a variância para médias não repetidas (*ANOVA*) com pós-teste de *Friedman*

Finalmente, usou-se o método de *Chi² de Pearson* para observar a significância estatística de diferenciação dos colifagos por família, tipo de amostra e local, pelas enzimas de restrição e pela rep-PCR.

4.3.2 Análise dos agrupamentos obtidos usando a metodologia molecular

Os resultados do rep-PCR e RFLP foram analisados utilizando-se o software BioNumerics (Applied Maths), versão 5.0. A análise de agrupamento foi realizada utilizando

os coeficientes de similaridade simples, de Dice e de Jaccard seguindo o limite de tolerância de 1%.

5 RESULTADOS

Um total de 130 amostras foram analisadas neste estudo, e destas, 73 foram de água do mar, 46 de plâncton e 11 de bivalves. A maior proporção de amostras foi obtida em São Sebastião (40 de água, 14 de plâncton e 4 de bivalves), seguida por Santos (21 de água, 20 de plâncton e 4 de bivalves) e Ubatuba (12 de água, 12 de plâncton e 3 de bivalves).

5.1 Caracterizações das regiões pelos parâmetros físico-químicos

5.1.1 Canal de São Sebastião

Tendo em conta os valores dos parâmetros físico-químicos fornecidos pelo CEBIMar-USP, no Canal de São Sebastião a salinidade variou de 34 a 35‰, a temperatura de 21,5 a 26,3 °C, a condutividade de 37,6 a 49,4 mS e o pH de 8,10 a 8,61 (Figura 15). Os valores de média aritmética, mediana e desvio padrão estão sendo mostrados na tabela 5 (p.80).

Não houve diferenças significantes entre os dois pontos de coleta, por isso foi calculado a média aritmética.

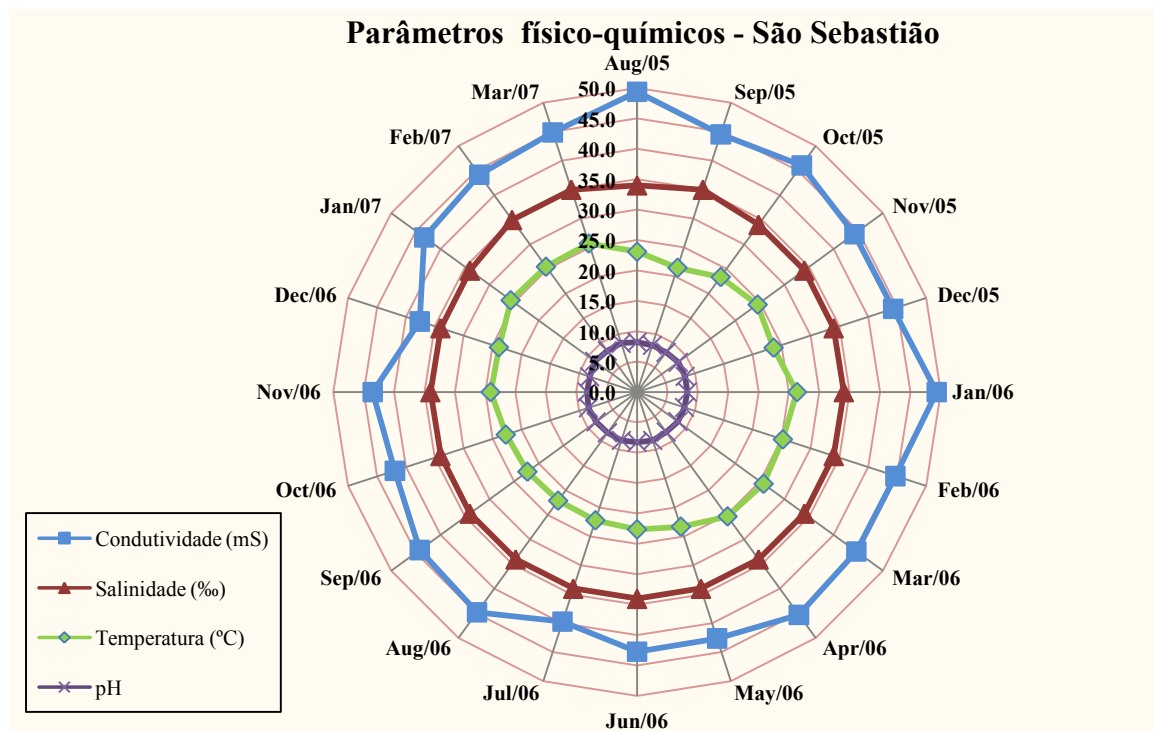


Figura 15- Valores dos parâmetros físico-químicos determinados em amostras de água do mar do Canal de São Sebastião. Fonte: CEBIMar-USP.

5.1.2 Baixada Santista

As variações de temperatura, salinidade, temperatura e condutividade com os valores mínimos, máximos, mediana, média aritmética e desvio padrão estão sendo mostradas na tabela 5.

No ponto 1, a condutividade variou entre 31,8 mS a 48,0 mS, a salinidade oscilou entre 19,7 e 31,3 ‰, a temperatura teve variações evidentemente significantes entre 16,3 e 28,5 °C e o pH variou de 7,0 a 8,0. (Figura 16A).

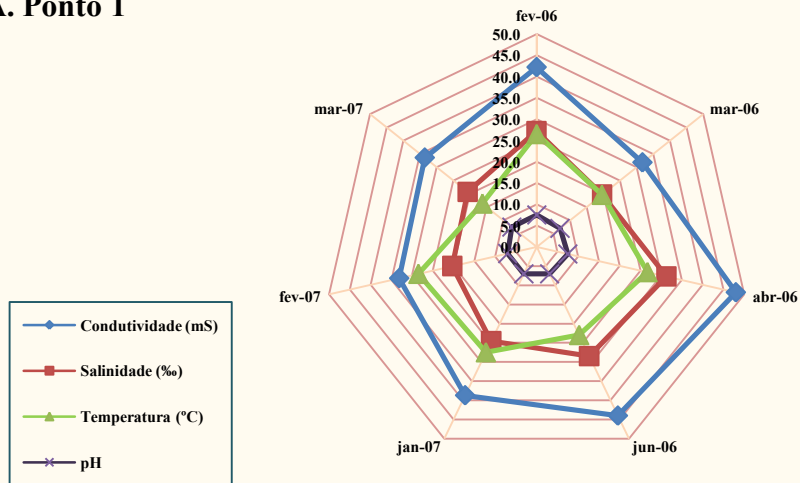
No ponto 2, a condutividade mudou de 25,9 a 48,8 mS, a salinidade de 15,5 a 31,8 ‰, a temperatura de 15,9 a 28,0 °C e o pH oscilou entre 7,0 e 8,0 (Figura 16B).

No ponto 3, a condutividade teve uma variação de 35,5 a 45,3 mS, a salinidade de 22,0 a 29,1‰, a temperatura de 15,2 a 28,0 °C e o pH oscilou entre 6,5 e 8,0 (Figura 16C).

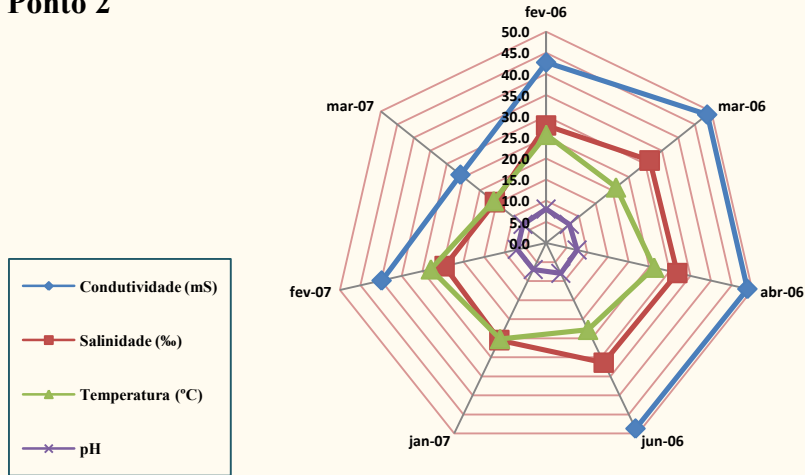
A variação da temperatura em Santos foi característica para a época de verão. O valor observado no teste ANOVA ($p=0,016$) demonstrou que existe pelo menos uma região com diferença estatisticamente significativa de outra em relação a este parâmetro. Isto foi comprovado pelo teste estatístico LSD, onde foi encontrada diferença significativa apenas entre Ponto 1 e P3 ($p=0,006$).

Observaram-se diferenças significativas entre os pontos, por isso foi analisado separadamente para a interpretação dos resultados obtidos na análise microbiológica. Os valores de pH foram normais para água estuarina e de plataforma, valores altos e baixos foram observados em Santos (Litoral Sul).

A. Ponto 1



B. Ponto 2



C. Ponto 3

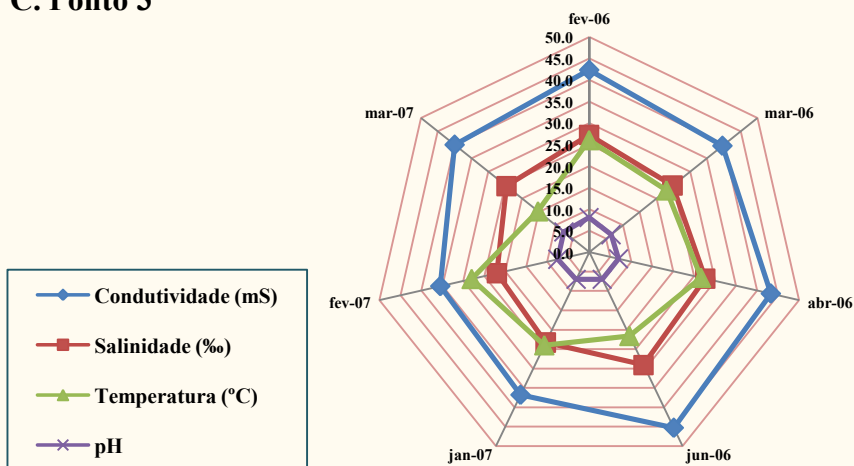


Figura 16- Valores dos parâmetros físico-químicos determinados em amostras de água do mar da Baixada Santista, por ponto de coleta. **A.** Ponto 1, **B.** Ponto 2, **C.** Ponto 3.

5.1.3 Ubatuba

Nas amostras de água, a salinidade variou de 26,4 a 31,7‰, e a temperatura, condutividade e pH variaram de 25,3 a 31,9 °C, 41,0 a 49,9 mS, 7,0 a 8,0, respectivamente (Figura 17). Na tabela 5, estão sendo mostrados os valores de mínimo, máximo, média aritmética, mediana e desvio padrão.

Ao analisarmos os resultados dos parâmetros físico-químicos estudados nas amostras de água observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois pontos de coleta do litoral de Ubatuba por isso foram usadas as médias aritméticas para interpretação dos resultados.

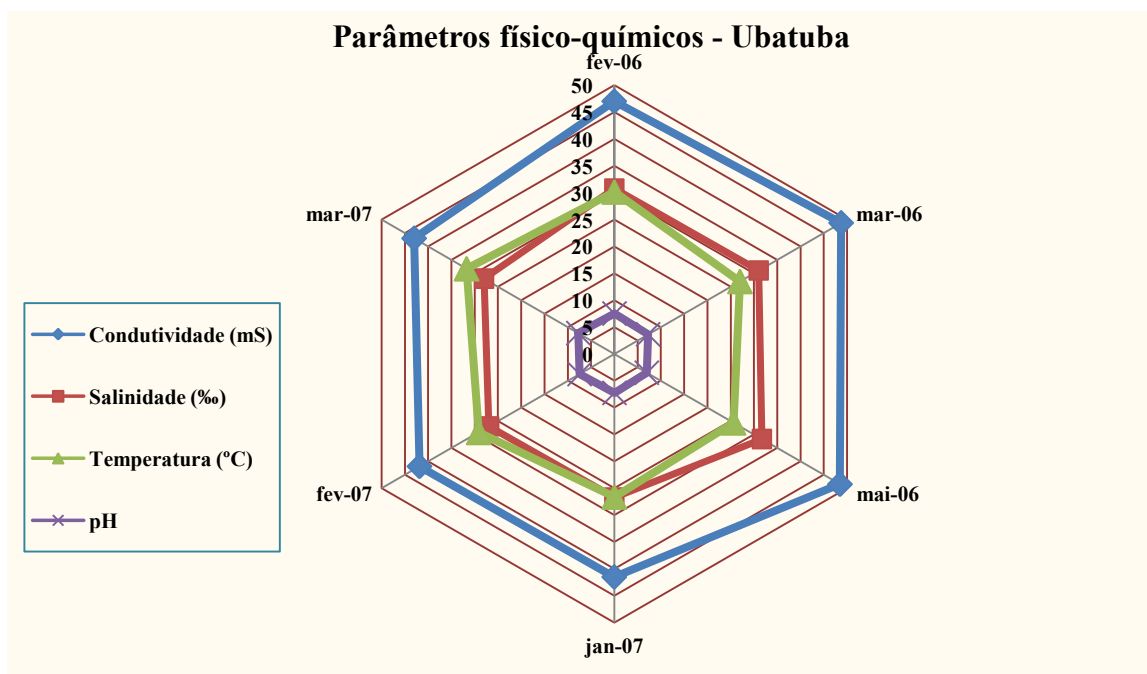


Figura 17- Média aritmética dos parâmetros físico-químicos determinados em amostras de água do mar de Ubatuba.

5.2 Análises Microbiológicas

5.2.1 Caracterização microbiológica da área de São Sebastião

As contagens de colifagos somáticos oscilaram entre <1 e 15 UFP/100 mL em 10% das amostras de água e entre <1 e $4,2 \times 10^2$ UFP/g em 42,8% das amostras de plâncton. Em bivalves somente duas das amostras (2/4) apresentaram placas de lises com contagens baixas que oscilaram entre 1 e 2 UFP/g (Tabelas 5, 7 e 9). Para as contagens de coliformes

termotolerantes os resultados variaram de <1 a $2,8 \times 10^2$ UFC/100 mL em 52,5% das amostras de água (Figura 18). Somente cinco amostras (12,5%) apresentaram enterococos, com contagens que variaram de 1 a $6,2 \times 10^1$ UFC/100 mL (Tabelas 5 e Figura 18).

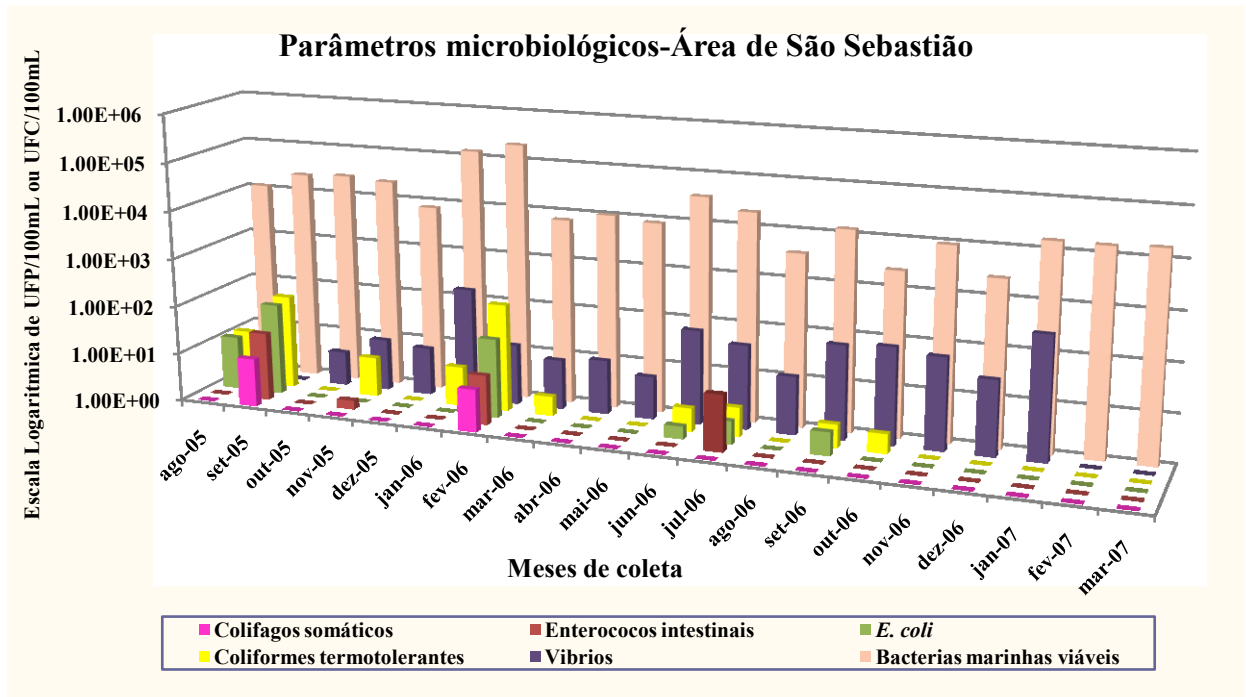


Figura 18 - Média aritmética dos parâmetros microbiológicos determinados em amostras de água do mar na área de São Sebastião.

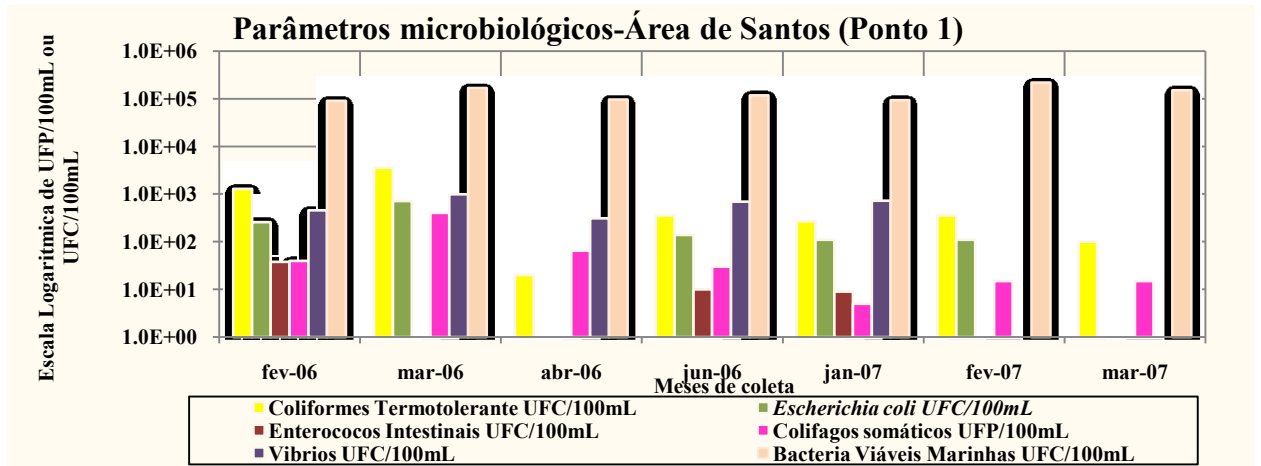
5.2.2 Caracterização microbiológica da área de Santos

Colifagos somáticos estiveram presentes em 76,2% das amostras de água do mar, variando de <1 até $3,4 \times 10^3$ UFP/100 mL em comparação com 85% das amostras de plâncton que oscilaram entre <1 e $4,7 \times 10^2$ UFP/g e em 50% das amostras de bivalves cujas contagens variaram de <1 a $2,2 \times 10^1$ UFP/g (Tabelas 5, Figura 19).

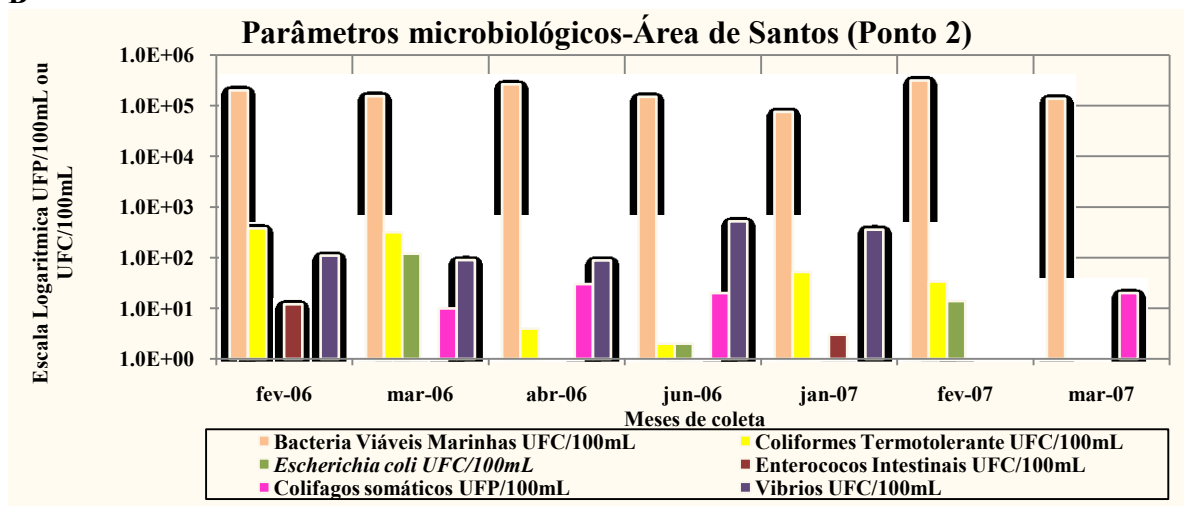
As contagens de coliformes termotolerantes em 95,2% das amostras positivas para este indicador variaram de <1 a $8,4 \times 10^3$ UFC/100 mL. No caso de enterococos, os resultados variaram de <1 a $5,8 \times 10^1$ UFC/100 mL (Tabela 5 e Figura 19).

Na tabela 5 pode-se observar que as máximas contagens de colifagos em amostras de água do mar, plâncton e bivalves foram obtidas em Santos $3,4 \times 10^3$ UFP/100 mL, $4,7 \times 10^2$ UFP/g e $2,2 \times 10^1$ UFP/g, respectivamente.

A



B



C

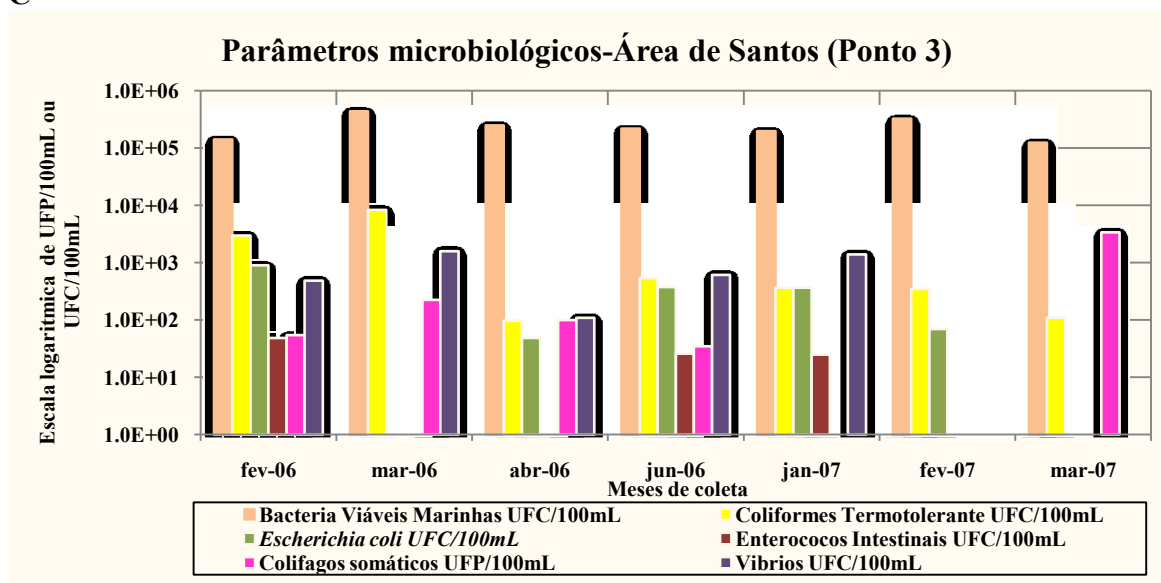


Figura 19 - Parâmetros microbiológicos determinados em amostras de água do mar na área de Santos, por ponto de coleta. **A.** Ponto 1; **B.** Ponto 2; **C.** Ponto 3.

5.2.3 Caracterização microbiológica da área de Ubatuba

Nas 12 amostras de água do mar analisadas no verão 2006 e 2007 coliformes termotolerantes e enterococos foram ausentes em 91,7% das amostras. Não se encontraram placas de lises para colifagos somáticos em amostras de água do mar (Figura 20).

Somente 12,5 % das amostras de plâncton foram positivas para colifagos somáticos e as contagens oscilaram entre <1 e 10 UFP/g e em amostras de bivalves 33,3% das amostras apresentaram placas de lise com contagens que variaram de <1 a 14 UFP/g (Tabela 5).

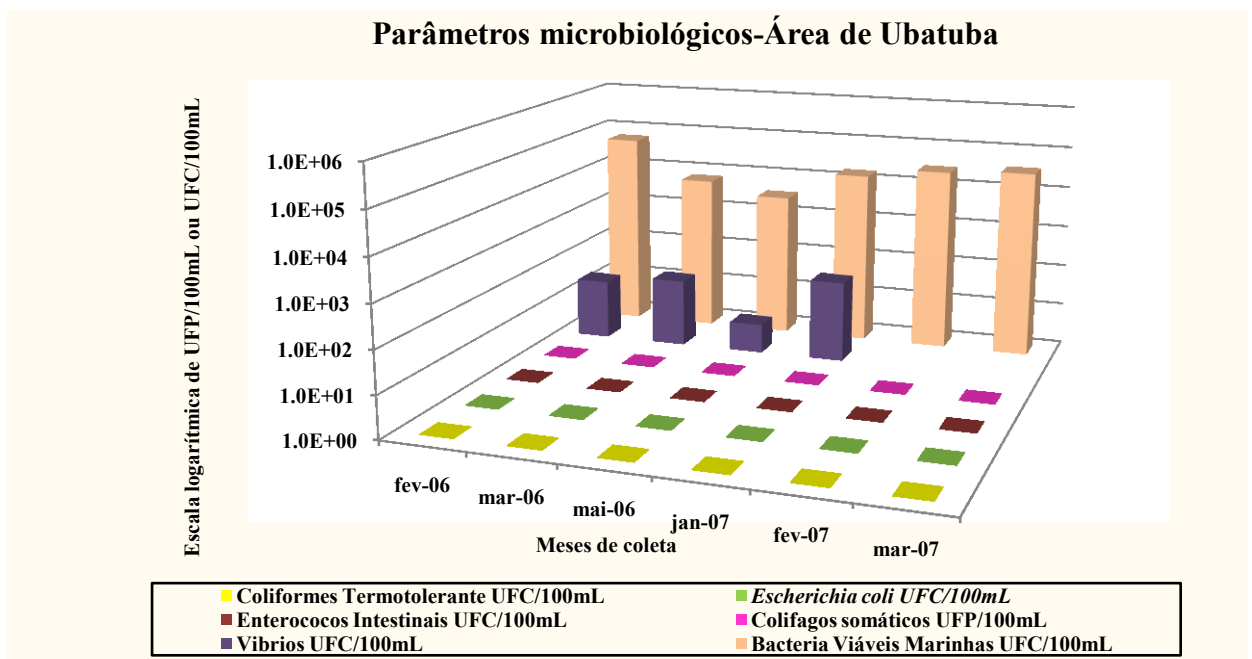


Figura 20 - Média aritmética dos parâmetros microbiológicos determinados em amostras de água do mar na área de Ubatuba.

Tabela 5- Valores mínimos, máximos, medianas, médias aritméticas e desvio padrão das variáveis físico-químicas e microbiológicas nos três ecossistemas estudados.

Parâmetro	Parâmetro	Santos						São Sebastião						Ubatuba											
		n	%(+)	m	M	Med	X	DP	n	%(+)	m	M	Med	X	DP	n	%(+)	m	M	Med	X	DP			
Físico-químicos	Temperatura (°C)			15,2	28,5	25,2	23,7	4,0			21,5	26,3	23,8	23,9	1,4			25,3	31,9	27,8	27,8	2,3			
	pH			6,5	8	7,0	7,3	0,4			8,1	8,6	8,3	8,3	0,1			7	8	7,5	7,5	0,3			
	Salinidade (‰)			15,5	31,8	25,5	25,7	4,3			34	35	34	34,2	0,4			26,4	31,7	28,3	28,3	2,0			
	Condutividade (ms)			14,0	48,8	40	39,2	8,2			37,6	49,4	44,2	44,1	2,6			41,0	49,9	43,4	43,4	3,1			
Amostras de água do mar	Colifagos UFP/100 mL			76,2	<1	3,4x10 ³	2,0x10 ¹	2,1x10 ²	7,2x10 ²			10	<1	1,5x10 ¹	<1	<1	1,5			0	<1	<1	<1	<1	0,0
	CT (UFC/100 mL)			95,2	<1	8,4x10 ³	3,2x10 ²	9,4x10 ²	1,9x10 ³			52,5	<1	2,9x10 ²	1,0	<1	6,3x10 ¹			8,3	<1	1	<1	8,3x10 ⁻²	2,8x10 ⁻¹
	EF (UFC/100 mL)			47,6	<1	4,9x10 ¹	<1	8,3	1,4x10 ¹			12,5	<1	6,2x10 ¹	<1	<1	1,2x10 ¹			0	<1	<1	<1	<1	0,0
	<i>E.coli</i> (UFC/100mL)	21		61,9	<1	8,4x10 ³	4,9x10 ¹	1,6x10 ²	2,4x10 ²	40		27,5	<1	8,6x10 ¹	<1	<1	2,5x10 ¹	12		0	<1	1,0	<1	8,3x10 ⁻²	2,8x10 ⁻¹
	CV/ (UFC/mL)			100	8,9x10 ¹	1,6x10 ³	5,7x10 ²	4,9x10 ²	4,4x10 ²			100	2,0x10 ⁰	4,6x10 ²	2,0x10 ¹	6,7x10 ¹	1,1x10 ²			100	2,0x10 ⁰	1,3x10 ²	2,7x10 ¹	4,1x10 ¹	4,1x10 ¹
	BVM (UFC/100mL)			100	7,6x10 ¹	4,4x10 ⁵	1,6x10 ⁵	1,9x10 ⁵	9,0x10 ⁴			100	2,0x10 ³	3,4x10 ⁵	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	5,9x10 ⁴			100	2,0x10 ³	9,2x10 ⁴	1,6x10 ⁴	2,4x10 ⁴	2,5x10 ⁴
Amostras de plâncton	Colifagos UFP/g			85	<1	4,7x10 ²	3,3x10 ¹	1,5x10 ²	1,6x10 ²			42,8	<1	4,2x10 ²	<1	2,4x10 ¹	8,0x10 ¹			25	<1	1,0x10 ¹	<1	1,9x10 ⁰	3,5x10 ⁰
	CV (UFC/g)	20		100	<1	1,8x10 ⁶	2,5x10 ⁵	4,3x10 ⁴	5,1x10 ⁵	14		100	6,0x10 ²	1,4x10 ⁶	2,8x10 ⁴	2,1x10 ⁵	3,8x10 ⁵	12		100	6,8x10 ³	8,0x10 ⁵	8,7x10 ⁴	2,2x10 ⁵	2,6x10 ⁵
Amostras de bivalves	Colifagos UFP/g			50	<1	2,2x10 ⁴	5,0x10 ¹	5,8x10 ⁰	9,4x10 ⁰			50	<1	2,0x10 ⁰	5,0x10 ⁻¹	7,5x10 ⁻¹	8,3x10 ⁻¹			33,3	<1	1,4x10 ¹	<1	4,7x10 ⁰	6,6x10 ⁰
	CV/ (UFC/g)	4		100	8,1x10 ²	8,4x10 ³	3,7x10 ³	4,1x10 ³	2,7x10 ³	4		100	1,2x10 ⁴	2,7x10 ⁷	1,6x10 ³	2,8x10 ⁵	4,8x10 ⁵	3		100	1,2x10 ³	2,1x10 ⁵	1,8x10 ³	7,1x10 ⁴	9,8x10 ⁴

Legenda: n: número de amostras analisadas, %(+):Porcentagem das amostras que foram positivas para o parâmetro microbiológico analisado , m: Valor mínimo, M: Valor máximo, UFP: Unidades Formadoras de Placas, UFC: Unidades Formadoras de Colônias, CV: Contagem de vibrios, BVM: Bactérias Viáveis Marinhas .

5.3 Detecção de Vibriófagos

A pesar de terem sido usados diferentes meios de cultura e várias cepas hospedeiras (*V.cholerae* O1 ElTor, *V.cholerae* O1 RC25 e RC28) durante os sete meses de coleta em São Sebastião, não foi possível observar placas de lise nas 19 amostras estudadas (14 de água do mar, 4 de plâncton e uma amostra de bivalves).

5.4 Pesquisa de *V.cholerae* pela técnica de enriquecimento

A metodologia tradicional de enriquecimento em caldo APA permitiu a obtenção de 50 isolados presuntivos (24 de Santos, 17 de São Sebastião e 9 de Ubatuba) de água do mar, plâncton e bivalves. Entretanto, quando confirmados pelas técnicas de PCR e ERIC-PCR os resultados foram negativos para a presença de *V.cholerae* nas amostras analisadas dos três ecossistemas estudados.

5.5 Seqüenciamento dos isolados presuntivos de *V.cholerae*

Com o auxílio do programa Bioedit versão 7.0.9 para a edição das seqüências e com a comparação nos bancos de dados do BLAST e RDP (The Ribosomal Database Project), foi possível identificar 36 dos 50 isolados identificados como presuntivos de serem *V.cholerae*. Apresentaram-se diferenças na identificação usando os dois bancos de dados, mas os dois coincidiram em não encontrar a espécie de *V.cholerae* nas alternativas de identificação. Tendo em conta as seqüências do BLAST com mais de 96% de similaridade, as freqüências das espécies encontradas foram: *V.campbellii* (8), *V.natriegens* (4), *V.proteolyticus* (4), *V.rotiferianus* (4), *V. olivaceus* (3), *V.vulnificus* (2), *V.paraahaemolyticus* (1), *V.furnissii* (1), *V.alginolyticus* (1), *V.diabolicus* (1), *V.agarivorans* (1), *V.harveyi* (1), *V.splendidus* (1), *V.nigripulchritudo* (1), *Pseudoalteromonas sp.* (1) e *Vibrio sp.* (1) (ANEXO A).

5.6 Relação das concentrações de colifagos somáticos com os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, nos três ambientes

Os dados dos valores dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram analisados como um conjunto de dados agrupados para determinar correlações entre os indicadores bacterianos e os colifagos somáticos. Foram encontradas correlações razoáveis entre as contagens de colifagos somáticos (CS), bactérias marinhas viáveis ($r=0,620$, $p=0,0001$) e coliformes termotolerantes ($r=0,626$, $p=0,0001$). Correlação moderada entre CS e *E.coli* ($r=0,462$, $p=0,0001$) e uma correlação fraca entre CS e enterococos intestinais ($r=0,247$, $p=0,035$). Com relação aos parâmetros físico-químicos foi observada uma correlação negativa com a temperatura ($r=-0,336$, $p=0,004$) (Tabela 6).

Tabela 6- Coeficiente de correlação de *Spearman* entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos determinados nas amostras de água dos três ambientes estudados.

PARÂMETRO		CONDUTIVIDADE	SALINIDADE	TEMPERATURA	PH	BMV	CT	EC	EI
Salinidade (%)	Coefficiente de correlação	0.909							
	Sig. (2-tailed)	0.000							
	N	73							
Temperatura	Coefficiente de correlação	0.068	0.081						
	Sig. (2-tailed)	0.568	0,497						
	N	73	73						
pH	Coefficiente de correlação	-0.112	-0.135	0.288					
	Sig. (2-tailed)	0.345	0.255	0.014					
	N	73	73	73					
MVB	Coefficiente de correlação	-0.017	-0.081	-0.025	-0.110				
	Sig. (2-tailed)	0.889	0.496	0.834	0.353				
	N	73	73	73	73				
CT	Coefficiente de correlação	-0.103	-0.103	-0.267	-0.252	0.689			
	Sig. (2-tailed)	0.386	0.385	0.022	0.031	0.0001			
	N	73	73	73	73	73			
EC	Coefficiente de correlação	-0.067	-0.107	-0.254	-0.271	0.450	0.679		
	Sig. (2-tailed)	0.574	0.369	0.030	0.020	0.0001	0.0001		
	N	73	73	73	73	73	73		
EI	Coefficiente de correlação	0.077	0.073	-0.214	-0.160	0.370	0.527	0.583	
	Sig. (2-tailed)	0.517	0.538	0.069	0.176	0.001	0.0001	0.0001	
	N	73	73	73	73	73	73	73	
CS	Coefficiente de correlação	-0.088	-0.130	-0.336	-0.126	0.620	0.626	0.462	0.247
	Sig. (2-tailed)	0.461	0.274	0.004	0.287	0.0001	0.0001	0.0001	0.035
	N	73	73	73	73	73	73	73	73

Legenda: N= número de amostras analisadas, BMV= Bactérias marinhas viáveis; CT= Coliformes termotolerantes; EC= *Escherichia coli*; EI= Enterococos intestinais; CS= Colifagos somáticos.

Com relação aos outros parâmetros microbiológicos determinados foi observada uma correlação negativa fraca entre a temperatura e: coliformes termotolerantes ($r = -0,267$, $p = 0,022$), *E. coli* ($r = -0,254$, $p = 0,030$) e enterococos intestinais ($r = -0,214$, $p = 0,069$). O pH também foi correlacionado negativamente com a presença de coliformes termotolerantes ($r = -0,252$, $p = 0,031$) e *E. coli* ($r = -0,271$, $p = 0,020$) (Tabela 6).

Os indicadores de poluição fecal, coliformes termotolerantes ($r = 0,689$, $p = 0,0001$) *E. coli* ($r = 0,450$, $p = 0,0001$) e enterococos intestinais ($r = 0,370$, $p = 0,0001$) encontraram-se correlacionados moderadamente com a presença de bactérias marinhas viáveis. Observaram-se correlações razoáveis entre as contagens de coliformes termotolerantes e *E. coli* ($r = 0,679$, $p = 0,0001$) e enterococos intestinais ($r = 0,527$, $p = 0,0001$) (Tabela 6).

Na figura 21, apresentam-se cinco peças importantes de informação sobre o conjunto de dados relacionados com os indicadores bacterianos determinados nas amostras da água do mar nos três ambientes estudados. A mediana dos dados é representada pela linha no centro da caixa retangular, as duas extremidades do retângulo representam os quartis, o quartil superior T3 e na parte inferior, o quartil T1. Os outros dois valores são para mostrar o valor máximo e mínimo do conjunto de dados. A figura mostra as diferenças significativas encontradas em cada região, se evidenciando as maiores contagens de indicadores microbiológicos na área de Santos, tanto para bactérias marinhas viáveis (A), como para coliformes termotolerantes (B), *E. coli* (C) e enterococos intestinais (D).

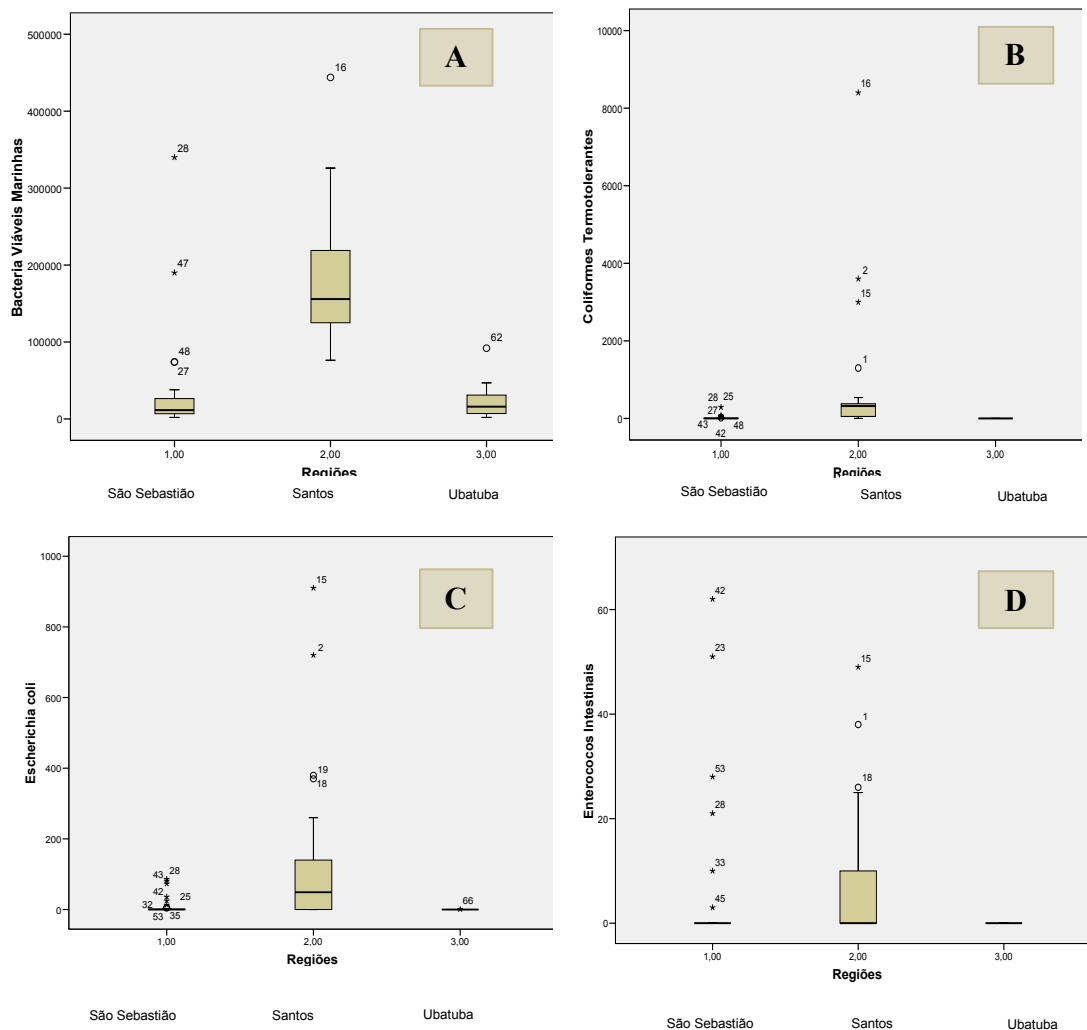


Figura 21- Boxplot dos indicadores microbiológicos correlacionados com os colifagos somáticos nos três ecossistemas estudados. **A.** Bactérias Marinhas Viáveis, **B.** Coliformes termotolerantes, **C.** *Escherichia coli*, **D.** Enterococos intestinais.

5.7 Indução de *V.cholerae* CTX (+)

Neste experimento, onze cepas de *V. cholerae* O1 e não O1 isoladas de água do mar e esgotos e oito cepas de *V. cholerae* O1 de origem clínica isoladas em outros países foram submetidas à indução de profagos utilizando luz ultravioleta (UV) e mitomicina C. Todas as cepas evidenciaram a presença da toxina CTX quando confirmadas por PCR. Os isolados clínicos cresceram melhor a 30 °C e os isolados ambientais melhor a 25 °C.

Usando as duas metodologias: radiação ultravioleta (10 seg, 15 seg, 45 seg, 30 seg, 1 min, 5 min, 10 min e 15 min) e mitomicina C (0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL) não foram observadas placas de lise no meio de cultura.

Depois da observação dos sobrenadantes por microscopia eletrônica, foi confirmada a ausência de partículas fágicas nos induzidos e somente foram evidenciadas bactérias danificadas na sua estrutura celular (Figura 22C). Estes resultados mostraram que a dose de radiação com luz UV (Figura 22A) não foi eficiente para a indução dos profagos. Testes complementares poderiam ser feitos aumentando o tempo de exposição ou mudando a dose de radiação com luz ultravioleta. Alternativamente, maiores concentrações de mitomicina C provavelmente facilitarão a indução dos profagos.

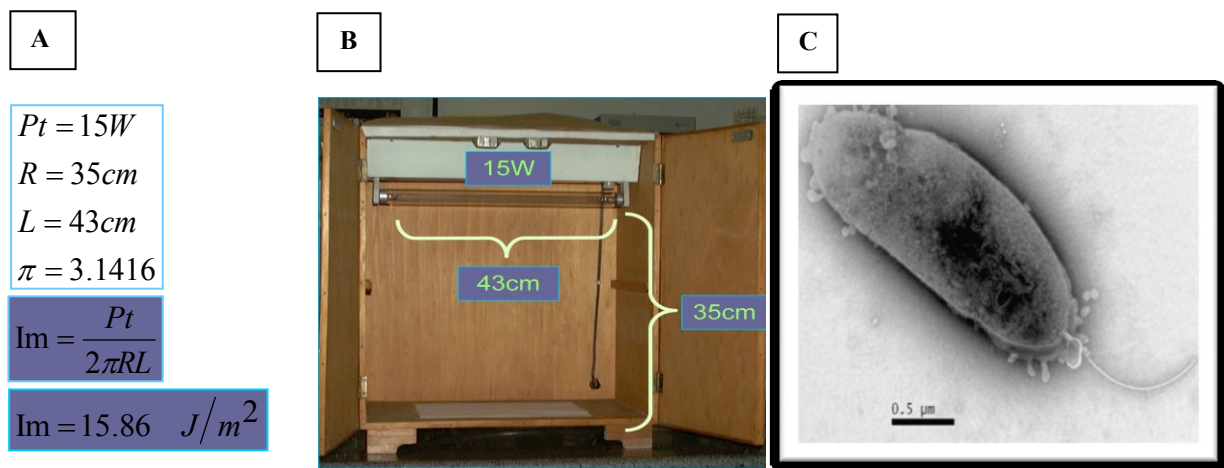


Figura 22- Indução de *V.cholerae* utilizando luz ultravioleta. **A.** Condições de indução; **B.** Caixa de madeira usada para a indução; **C.** Observação das cepas induzidas por microscopia eletrônica.

Legenda: Im: intensidade, Pt: potência da lâmpada, R: distância da lâmpada à amostra, L: longitude da lâmpada

O banco de cepas de *V.cholerae* que foi testado para avaliar a viabilidade celular permitiu observar que a melhor concentração de glicerol para preservação resulta em colocar a bactéria em glicerol a 20% dissolvido no mesmo caldo onde a bactéria foi cultivada (Figura 23B e 23D). A porcentagem de glicerol a 30% evidenciou perda de viabilidade significativa depois de dois meses de conservação e em algumas cepas perda absoluta de viabilidade depois de 6 meses (Figura 23A e 23C).

No boxplot (Figura 23) pôde-se observar cinco peças importantes de informação sobre os dados relacionados com a preservação nas duas concentrações de glicerol testadas. A mediana dos dados é representada pela linha no centro da caixa retangular. As duas extremidades do retângulo evidenciam os quartis, na parte superior o T3 e na inferior o T1. Os outros dois valores são para mostrar o valor máximo e mínimo para cada tempo de teste na concentração de 20 e 30% de glicerol.

Foi evidente a perda de viabilidade celular das cepas clínicas depois de 12 meses de conservação em glicerol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A mediana para as cepas conservadas em 30% de glicerol foi de $3,8 \times 10^1$ UFC/mL e de $9,7 \times 10^3$ UFC/mL em glicerol 20% (Anexo B).

Nas amostras ambientais foi observada uma mediana de <1 UFC/mL para as cepas conservadas por 12 meses em glicerol 30% e de $9,3 \times 10^3$ UFC/mL as que foram conservadas em glicerol a 20%. Contagens que diferem significativamente quando comparadas com as contagens iniciais de $3,9 \times 10^7$ UFC/mL (tempo 0) (Anexo C).

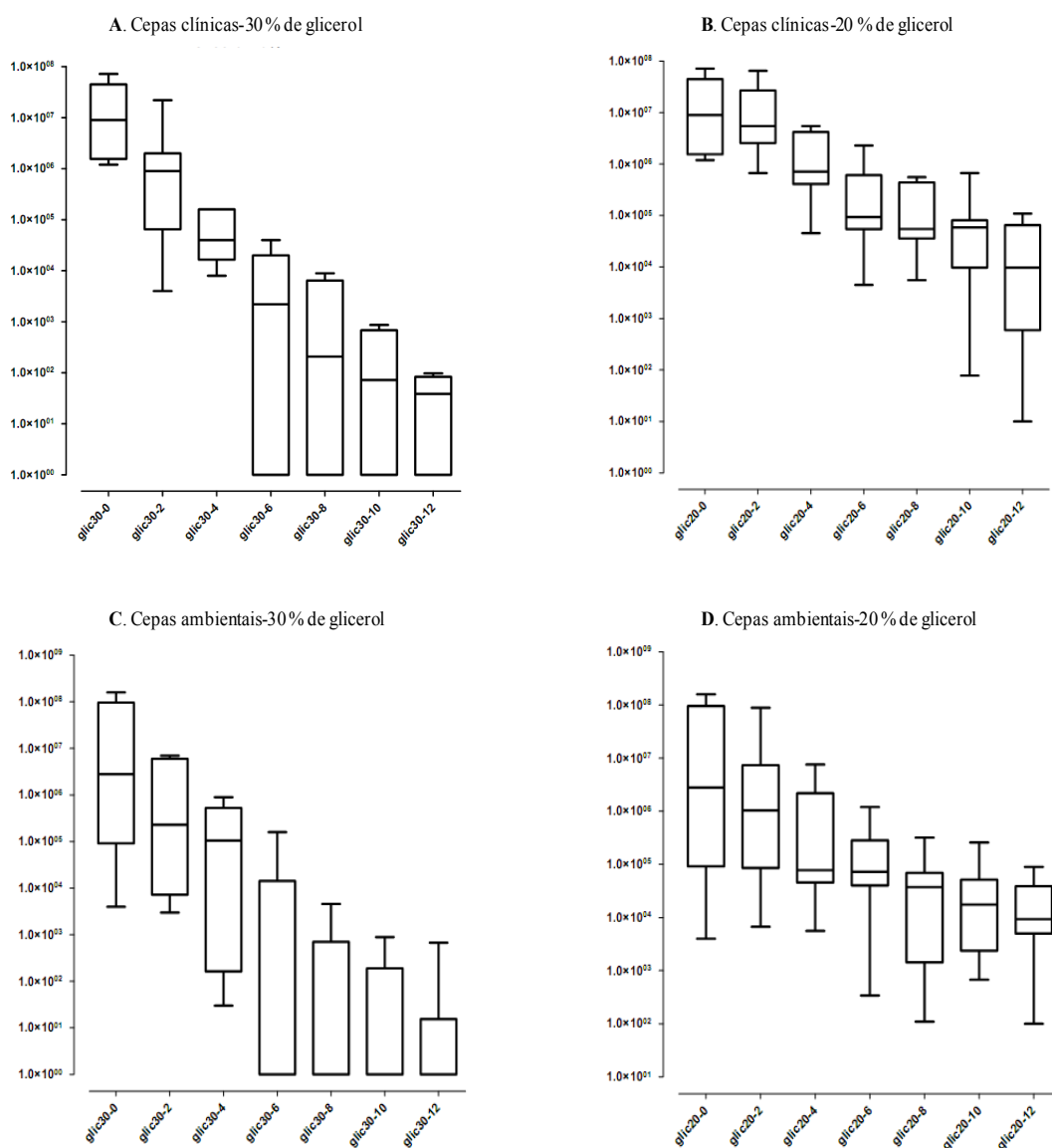


Figura 23- Comportamento das cepas conservadas em glicerol durante um ano de estudo. **A.** Cepas clínicas conservadas em 30% de glicerol; **B.** Cepas clínicas conservadas em 20% de glicerol; **C.** Cepas ambientais conservadas em glicerol 30%; **D.** Cepas ambientais conservadas em glicerol 20%.

5.8 Caracterização morfológica e microscópica dos colifagos somáticos isolados

Um total de 62 colifagos foram estudados, 22 isolados de água do mar, 38 de plâncton e 2 de bivalves. Usando a digestão total com RNase e DNase, confirmou-se que 100% dos isolados de colifagos eram de DNA. Nesta pesquisa foram observadas diversas morfologias de placas de lise com diferentes tamanhos, variando desde 0,27 mm até 8 mm de diâmetro, com a presença ou não de halo, com bordas lisas ou irregulares (Figura 24). O agrupamento dos bacteriófagos em famílias e tipos foi feito com base na morfologia das partículas por microscopia eletrônica (ACKERMANN, 1996).

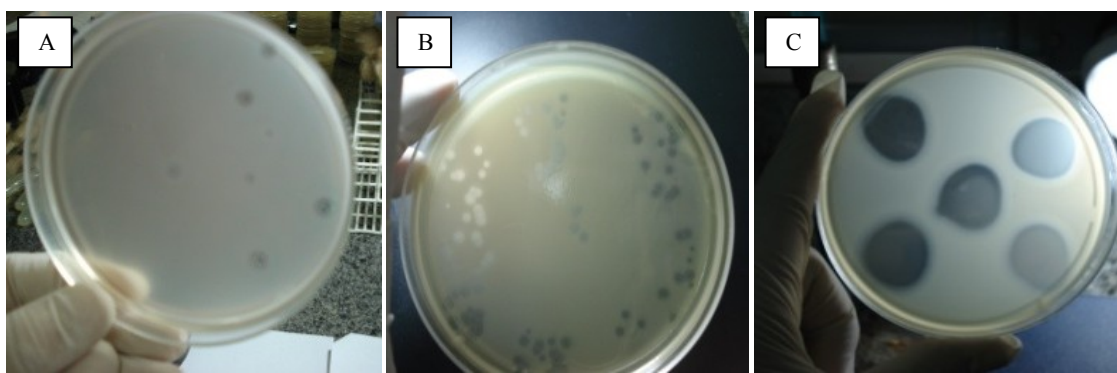


Figura 24- Colifagos somáticos na técnica de semeadura em placa. **A.** Enumeração de colifagos em ágar TSA modificado (APHA, 1998); **B.** Titulação dos fagos para extração de DNA; **C.** Procedimento de propagação de fagos para Microscopia eletrônica.

5.8.1 Amostras de água do mar

A partir das 40 amostras de água do mar de São Sebastião e 12 amostras de Ubatuba, não foi possível o isolamento de placas de lise.

Depois de serem analisadas 21 amostras de água do mar coletadas de Santos foi plausível o isolamento de 22 colifagos. Foram observadas várias morfologias de placas de lises com tamanhos diferentes, oscilando de 0,32 mm a 4 mm de diâmetro em *Siphoviridae* (50%), de 0,48 a 8 mm em *Podoviridae* (36,4%), de 1,99 a 8 mm em *Microviridae* (9%) e uma placa pertencente à família *Myoviridae* (4,5%) apresentou um diâmetro de 0,55 mm. As placas das famílias *Podoviridae* e *Siphoviridae*, em sua maioria apresentaram halo, as bordas foram lisas e em alguns casos irregulares (Tabela 7).

O maior número de isolados foi obtido no ponto 3 de Santos, local com contaminação doméstica e industrial. Foi observada a presença de CT em todas as amostras, porém 5 amostras apresentaram placas de lises com diferente morfologia, por isso neste ponto foi

obtido a maior abundância de colifagos. As famílias encontradas foram: *Siphoviridae* (75%), *Podoviridae* (17%) e *Myoviridae* (8%) (Tabela 7).

No ponto 1 (contaminação doméstica) foram observadas as seguintes proporções: *Podoviridae* (62,5%), *Microviridae* (25%), *Siphoviridae* (12,5%). É importante notar que no ponto 1, a presença de coliformes termotolerantes (CT) foi evidente (100%) nas amostras onde também foram detectados os colifagos somáticos (CS) (Tabela 7).

Tabela 7- Frequências dos parâmetros microbiológicos, colifagos somáticos (CS) e famílias de colifagos por região estudada.

Local	Ponto de coleta	N	Amostras (+) CS (%)	Amostras (+) CT (%)	Amostras (+) <i>E.coli</i> (%)	Total de isolados	† <i>Siphoviridae</i>	† <i>Podoviridae</i>	† <i>Microviridae</i>	† <i>Myoviridae</i>
Santos	P1	7	7/7 (100)	7/7 (100)	5/7 (71,4)	8	1/8 (12,5)	5/8 (62,5)	2/8 (25)	0/8 (0)
	P2	7	4/7 (57,1)	6/7 (85,7)	3/7 (42,8)	2	1/2 (50)	1/2 (50)	0/2 (0)	0/2 (0)
	P3	7	5/7 (71,5)	7/7 (100)	5/7 (71,4)	12	9/12(75)	2/12 (17)	0/12 (0)	1/12 (8)
	Total	21	16/21(76,2)	20/21(95,2)	13/21 (61,9)	22	11/22 (50)	8/22(36,4)	2/22 (9)	1/22 (4,5)
São Sebastião	P1	20	2/20 (10)	12/20 (60)	8/20 (40)	1 ^d	-	-	-	-
	P2	20	2/20 (10)	9/20 (45)	3/20 (15)	1 ^d	-	-	-	-
	Total	40	4/40 (10)	21/40 (52,5)	11/40 (27,5)	2^d				
Ubatuba	P1	6	0/6 (0)	1/6 (16,7)	0/6 (0)	0	-	-	-	-
	P2	6	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0	-	-	-	-
	Total	12	0/12 (0)	1/12 (8,3)	0/12 (0)	0				
Total Amostras	7	73	20/73 (27,4)	42/73 (42)	24/73(32,9)	22	11/22 (50)	8/22(36,4)	2/22 (9)	1/22 (4,5)

Legenda:

N: número de amostras analisadas

(+) CS: Proporção de amostras positivas para colifagos somáticos

(+) CT: Proporção de amostras positivas para coliformes termotolerantes

(+) *E.coli*: Proporção de amostras positivas para *E.coli*

†Expressado como o número de isolados de tipo morfológico/ o número de bacteriófagos isolados observados por microscopia eletrônica em cada ponto. Em colchetes se mostram as porcentagens com relação ao número total

No ponto 2, seis amostras de água do mar tiveram baixa contagem de CT e por isso somente 4 amostras apresentaram placas de lises (57,1%). Neste ponto, considerado como ponto controle, foram observadas as famílias *Siphoviridae* (50%) e *Podoviridae* (50%).

Os tamanhos, morfotipos e tipos dos colifagos observados pela microscopia eletrônica por ponto de coleta estão sendo mostrados na tabela 8 e figuras 25 e 26. Em média, no ponto 3, os fagos observados da família *Siphoviridae* (morfotipo B1, tipo T1) apresentaram diâmetros de cabeça de 58x58 nm e uma longitude de cauda de aproximadamente 116x10 nm (Tabela 8). Nesta pesquisa foi encontrado um colifago da família *Siphoviridae* isolado do ponto 3 de Santos com cauda de 939 nm a 995 nm de comprimento (Este fago não foi incluído na média aritmética da tabela 8), valores que chamam muito a atenção, pois não existem valores deste comprimento reportados na literatura para este tipo de colifagos (Figura 31A). Foram observados fagos com cabeças isométricas e caudas flexíveis não contráteis com

comprimentos de cauda de 121x6 nm (ponto 2) a 131x10 nm (ponto 3) na família *Siphoviridae*.

Os tipos ϕ X174 e YerA41 (isolados em março de 2007) somente foram observados no ponto 1 e no ponto 3, respectivamente, ambos os pontos são reportados como de maior atividade antrópica.

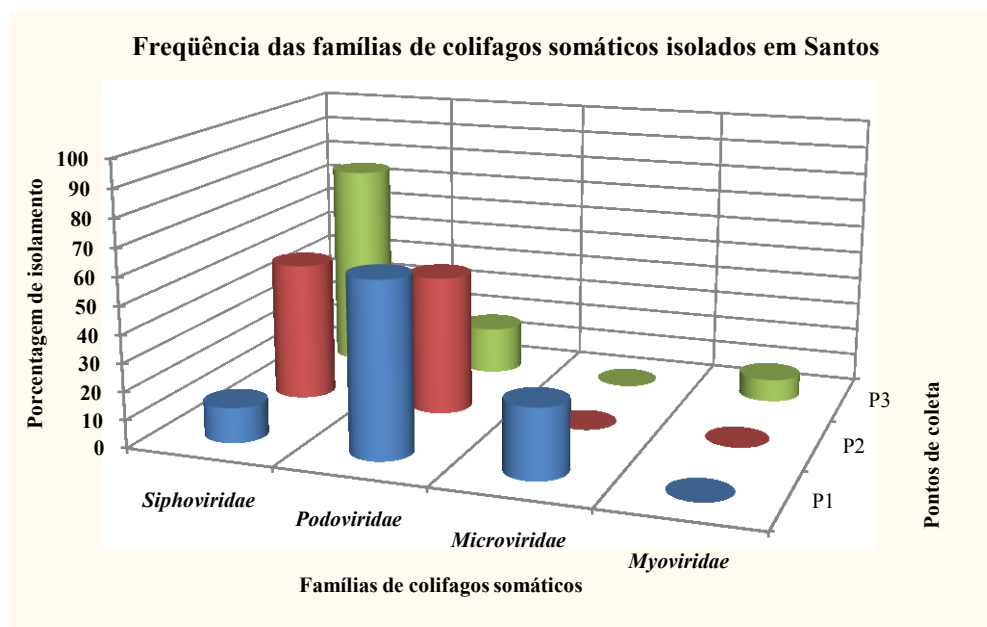


Figura 25- Frequência das famílias de colifagos somáticos em amostras de água do mar da Baixada Santista, por ponto de coleta.

Tabela 8- Famílias, morfotipos, tipos e média aritmética dos tamanhos dos colifagos somáticos isolados a partir de amostras de água do mar de Santos.

Ponto de coleta	Família	Número de isolados	Morfotipo	Tipo	CCBxLCB (nm)	CCxLC (nm)
Ponto 1	<i>Siphoviridae</i> (12.5%)	1	B1	T1	58 x 54	131 x 10
		1	C1	sd	56 x 56	0 x 0
	<i>Podoviridae</i> (62.5%)	2	C1	N4	48 x 48	24 x 26
		1	C1	B4	45 x 49	59 x 17
Ponto 2	<i>Microviridae</i> (25%)	1	C1	C1	61 x 56	33 x 15
		2	D1	ϕ X174	53 x 53	12 x 11
	<i>Siphoviridae</i> (50%)	1	B1	T1	54 x 51	121 x 6
		1	C1	N4	54 x 56	18 fios
Ponto 3	<i>Siphoviridae</i> (75%)	7	B1	T1	58 x 58	116 x 10
		1	B1	Vi II	76 x 76	175 x 14
	<i>Podoviridae</i> (17%)	1	C1	N4	58 x 58	0 x 0
		1	C1	sd	54 x 50	13 x 13
	<i>Myoviridae</i> (8%)	1	A1	YerA41	71 x 70	1115 x 23

Legenda:

CCBxLCB: Comprimento da cabeça vS Largura da cabeça

CCxLC: Comprimento da cauda vS largura da cauda

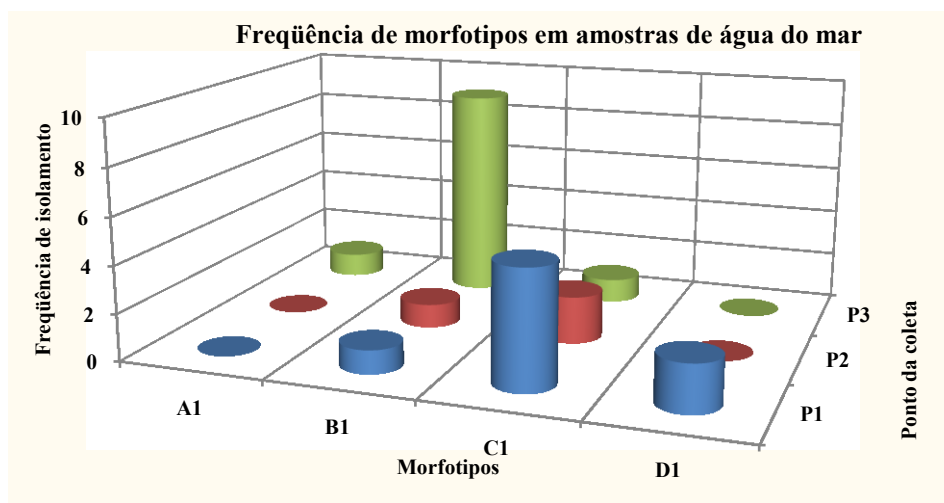


Figura 26- Frequência dos morfortipos em amostras de água do mar da Baixada Santista, por ponto de coleta.

5.8.2 Amostras de plâncton

A partir das amostras de plâncton foi possível isolar colifagos dos três locais estudados. Foram caracterizados por microscopia eletrônica 38 colifagos (23 de Santos, 12 de São Sebastião e 3 de Ubatuba) (Tabela 9).

A frequência das famílias e morfortipos de colifagos em Santos, por ponto de coleta estão sendo mostrados na figura 27 e 30. No ponto 1, foram isolados 16 colifagos (Tabelas 9 e 10, Figura 27). As famílias encontradas foram: *Siphoviridae* (68,8%) representada pelos tipos T1 e Vi II, *Podoviridae* (18,8%) com os tipos morfológicos *sd* e N4, *Microviridae* (6,2%) com somente o tipo ϕ X174 e *Myoviridae* (6,2%) com o tipo YerA41 (Figura 33A).

Tabela 9- Frequências de colifagos somáticos e famílias isoladas a partir de amostras de plâncton por área de estudo e ponto de coleta.

Local	Ponto de coleta	N	Amostras (+) CS (%)	Total de isolados	† <i>Siphoviridae</i>	† <i>Podoviridae</i>	† <i>Microviridae</i>	† <i>Myoviridae</i>
Santos	P1	7	6/7 (85,7)	16	11/16 (68,8)	3/16 (18,8)	1/16 (6,2)	1/16 (6,2)
	P2	7	5/7 (71,4)	1	0/1 (0)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)
	P3	6	6/6 (100)	6	6/6 (100)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
	Total	20	17/20 (85)	23	17/23 (74)	3/23 (13)	2/23 (8,7)	1/23 (4,3)
São Sebastião	P1	7	3/7 (42,8)	8	4/8 (50)	1/8 (12,5)	3/8 (37,5)	0/8 (0)
	P2	7	3/7 (42,8)	4	2/4 (50)	1/4 (25)	1/4 (25)	0/4 (0)
	Total	14	6/14 (42,8)	12	6/12 (50)	2/12 (16,7)	4/12 (33,3)	0/12 (0)
Ubatuba	P1	6	1/6 (16,7)	1	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)
	P2	6	2/6 (33,3)	2	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)
	Total	12	3/12 (25)	3	2/3 (75)	1/3 (25)	0/3 (0)	0/3 (0)

Legenda: N: número de amostras. (+) CS: Proporção de amostras positivas para colifagos somáticos. †Expressa o número de isolados de tipo morfológico/ o número de bacteriófagos isolados observados por microscopia eletrônica em cada ponto. Em parênteses se mostram as porcentagens em relação ao número total.

No ponto 2, isolou-se um colifago da família *Microviridae* (tipo ϕ X174) e no ponto 3, seis colifagos da família *Siphoviridae* (tipo T1 e Vi II) foram isolados. Em todos os pontos, a família predominante foi *Siphoviridae*. A família *Myoviridae* não foi encontrada (Figura 27).

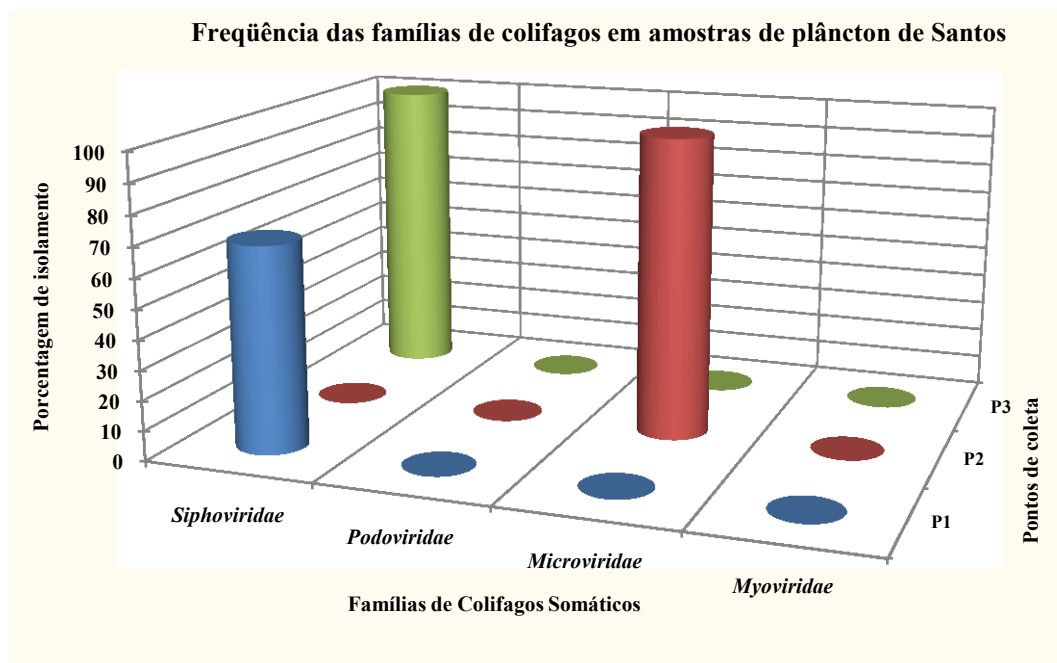


Figura 27- Freqüência das famílias de colifagos somáticos em amostras de plâncton da Baixada Santista, por ponto de coleta.

Na Baixada Santista foram observadas diferentes morfologias nas placas de lises com tamanhos de diâmetro que variaram de 0,8 mm a 6,8 mm em *Siphoviridae*, 1,4 a 5,2 mm (*Podoviridae*), 0,6 a 2,5 mm (*Microviridae*) e uma placa da família *Myoviridae* teve um diâmetro de 2 mm. A presença de halo foi observada em alguns isolados e as bordas lisas apresentaram-se nas famílias *Podoviridae* e *Siphoviridae*. A placa da família *Myoviridae* foi clara, lisa e regular.

Apesar de que os pontos 1 e 2 de São Sebastião terem sido similares estatisticamente, observaram-se pequenas diferenças na freqüência das famílias de colifagos. No ponto 1 foram encontradas as famílias: *Siphoviridae* (50%) representada pelos tipos T1 e Vi II, *Podoviridae* (12,5%) com o tipo morfológico N4, *Microviridae* (37,5%) como tipo ϕ X174 e *Myoviridae* não foi observada. No ponto 2, *Siphoviridae* (50%) (tipo T1), *Microviridae* (25%) (tipo ϕ X174) e *Podoviridae* (25%) (tipo N4) foram observadas (Tabelas 9 e 10, Figura 28).

A morfologia das placas dos colifagos de São Sebastião foi diversa. Os diâmetros variaram de 0,91 mm a 1,52 mm na família *Siphoviridae*, 1,03 a 1,15 mm em *Podoviridae*,

1,14 a 1,32 mm em *Microviridae*. Não foram isoladas placas da família *Myoviridae*. Todas as placas foram claras e regulares.

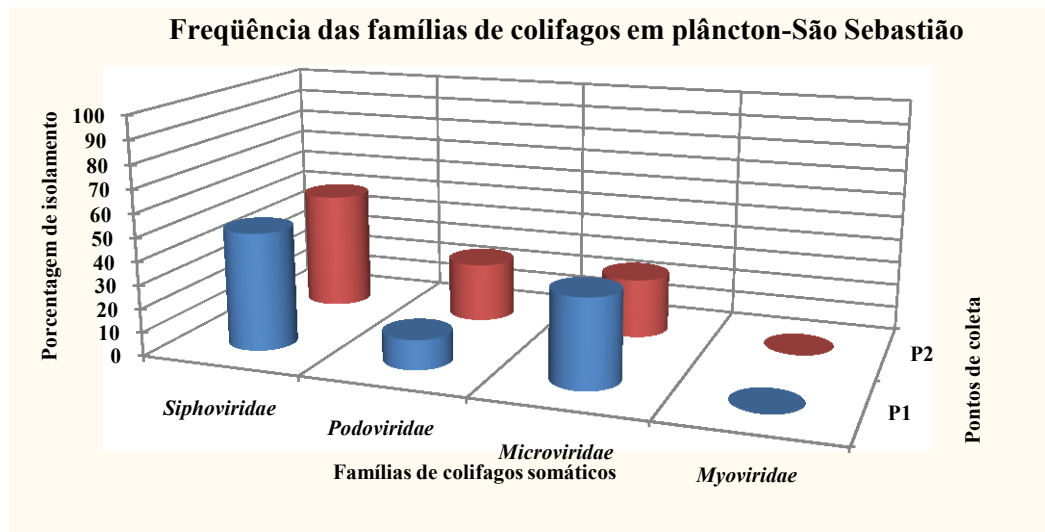


Figura 28- Frequência das famílias de colifagos somáticos em amostras de plâncton da área de São Sebastião, por ponto de coleta.

No ponto 1 de Ubatuba, somente foi observada a família *Podoviridae* (tipo sd), e no ponto 2, *Siphoviridae* (tipo T1) foi predominante (Tabelas 9, 10 e Figura 29). Os diâmetros das placas de *Siphoviridae* variaram de 0,95 a 1 mm. A placa isolada de *Podoviridae* apresentou um diâmetro de 1 mm. Os três colifagos isolados tiveram placas claras e regulares.

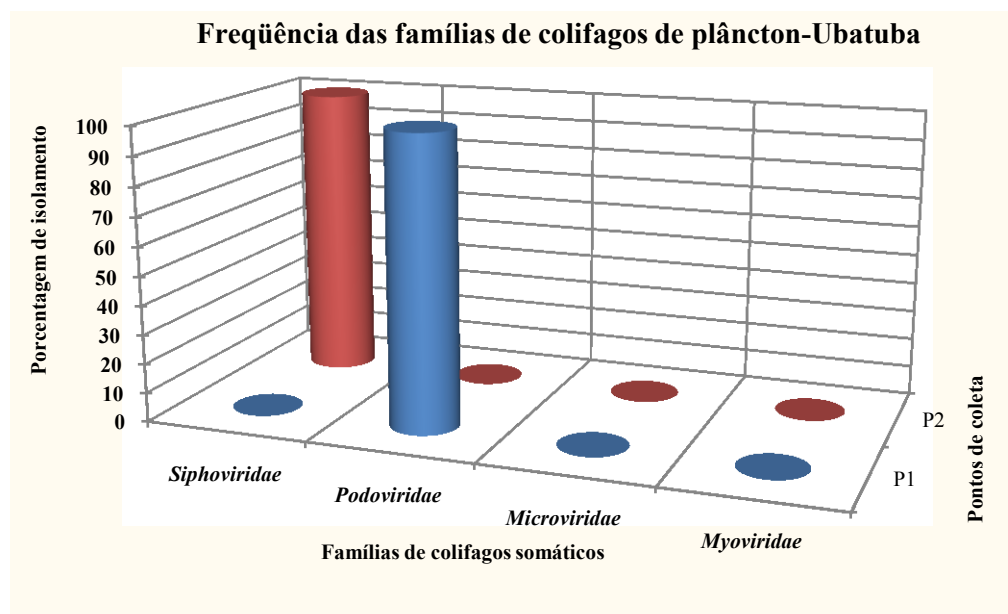


Figura 29- Frequência das famílias de colifagos somáticos em amostras de plâncton da área de Ubatuba, por ponto de coleta.

Tabela 10- Família, morfotipo, tipo e média aritmética dos tamanhos de colifagos somáticos isolados a partir de amostras de plâncton nas três áreas estudadas, por ponto de coleta.

Local	Ponto da coleta	Família	Número de isolados	Morfotipo	Tipo	CCBxLCB (nm)	CCxLC (nm)
Santos	Ponto 1	<i>Siphoviridae</i> (68.8%)	11	B1	T1	58x57	154x10
		<i>Podoviridae</i> (18.8%)	2	C1	sd	53x49	16x28
		<i>Podoviridae</i> (18.8%)	1	C1	N4	47x48	16x23
		<i>Microviridae</i> (6.2%)	1	D1	φX174	24x24	0x0
		<i>Myoviridae</i> (6.2%)	1	A1	YerA41	66x62	104x19
	Ponto 2	<i>Microviridae</i> (100%)	1	D1	φX174	28x26	0x0
Ponto 3	<i>Siphoviridae</i> (100%)	4	B1	T1	56x56	108x9	
		2	B1	Vi II	55x46	121x8	
São Sebastião	Ponto 1	<i>Siphoviridae</i> (50%)	3	B1	T1	58x62	212x9
		<i>Siphoviridae</i> (50%)	1	B1	Vi II	70x78	175x11
		<i>Microviridae</i> (37.5%)	3	D1	φX174	26x25	0x0
		<i>Podoviridae</i> (12.5%)	1	C1	N4	56x57	13x9
	Ponto 2	<i>Siphoviridae</i> (50%)	2	B1	T1	58x59	148x8
		<i>Microviridae</i> (25%)	1	D1	φX174	24x23	0x0
<i>Podoviridae</i> (25%)	1	C1	N4	55x54	0x0		
Ubatuba	Ponto 1	<i>Podoviridae</i> (100%)	1	C1	sd	61x54	93x7
	Ponto 2	<i>Siphoviridae</i> (100%)	2	B1	T1	62x65	127x7

Legenda:

CCBxLCB: Comprimento da cabeça vs Largura da cabeça

CCxLC: Comprimento da cauda vs largura da cauda

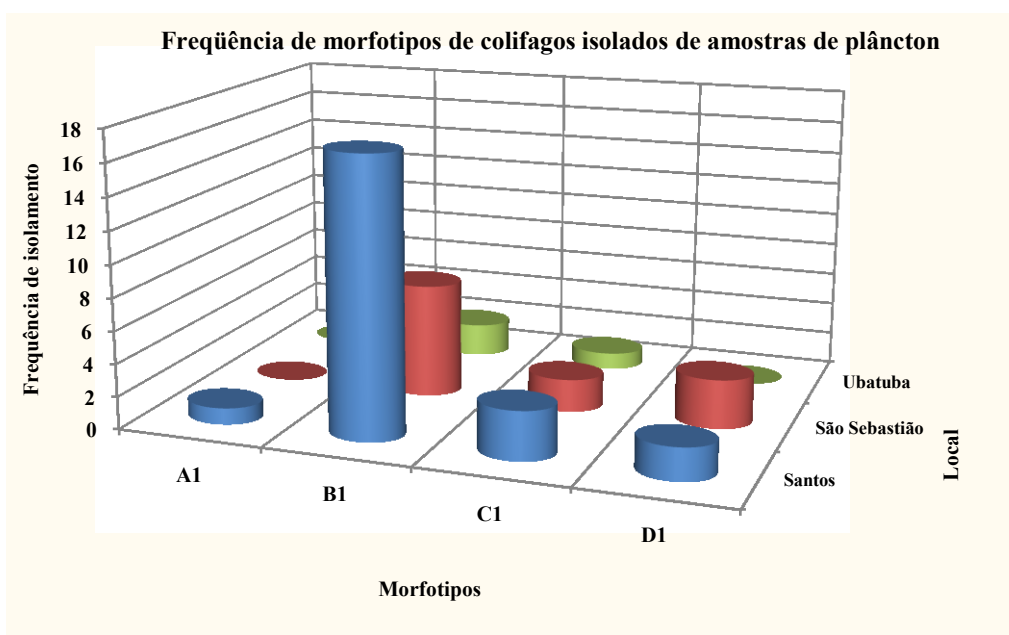


Figura 30- Freqüência dos morfotipos de colifagos somáticos isolados de amostras de plâncton nos três ecossistemas estudados (Santos, São Sebastião e Ubatuba).

5.8.3 Amostras de bivalves

Dos quatro colifagos isolados no estudo, somente dois foram incluídos para a caracterização microscópica, pois dois deles perderam sua infectividade depois de 3 semanas de serem armazenados em geladeiras 4 °C. Dois colifagos foram analisados por microscopia eletrônica, um de São Sebastião (*Siphoviridae*-tipo Vi II) e um de Ubatuba (*Siphoviridae*-tipo T1). Os diâmetros das placas foram de 3,5 mm (tipo Vi II) e de 1,5 mm a (tipo T1). O colifago isolado de Ubatuba apresentou a cauda mais comprida, 135 nm de comprimento x 8 nm de largura (Tabela 11).

Tabela 11- Frequência de colifagos somáticos, famílias, morfotipos, tipos e média aritmética dos tamanhos dos colifagos somáticos isolados a partir de amostras de bivalves por área estudada.

Local	Número de amostras	Amostras (+) CS (%)	Total de isolados	† <i>Siphoviridae</i>	Morfotipo	Tipo	CCBxLCB (nm)	CCxLC (nm)
Santos	4	2/4 (50)	2 ^d	0/0 (0)	-			
São Sebastião	4	2/4 (50)	1	1/1 (100)	B1	Vi II	51x52	70x10
Ubatuba	3	1/3 (33.3)	1	1/1 (100)	B1	T1	60x59	135x8
total	11	5/11 (45,4)	2	2/2 (100)				

Legenda:

(+) CS: Proporção de amostras positivas para colifagos somáticos

^d: Colifagos mortos, não estudados

†Expressão do número de isolados de tipo morfológico/ o número de bacteriófagos isolados observados por microscopia eletrônica em cada ponto. Em parênteses estão mostradas as porcentagens em relação ao número total.

CCBxLCB: Comprimento da cabeça vs Largura da cabeça

CCxLC: Comprimento da cauda vs largura da cauda

Em forma geral, do total dos colifagos estudados provenientes de áreas com atividade antrópica mínima (Ubatuba), a família *Siphoviridae* foi a mais freqüente (3/4), seguida por *Podoviridae* (1/4), enquanto que fagos das famílias *Microviridae* e *Myoviridae* não foram observados. Já em águas coletadas de áreas com moderado impacto humano (São Sebastião), as famílias *Siphoviridae* (53,8%), *Microviridae* (30,8%) e *Podoviridae* (15,4%) foram predominantes. Não foram detectados fagos pertencentes à família *Myoviridae*. Em Santos, área com atividade antrópica evidente, as principais famílias foram: *Siphoviridae* (62,2%), *Podoviridae* (24,4%), *Microviridae* (8,9%) e *Myoviridae* (4,4%) (Figuras 31 a 34).

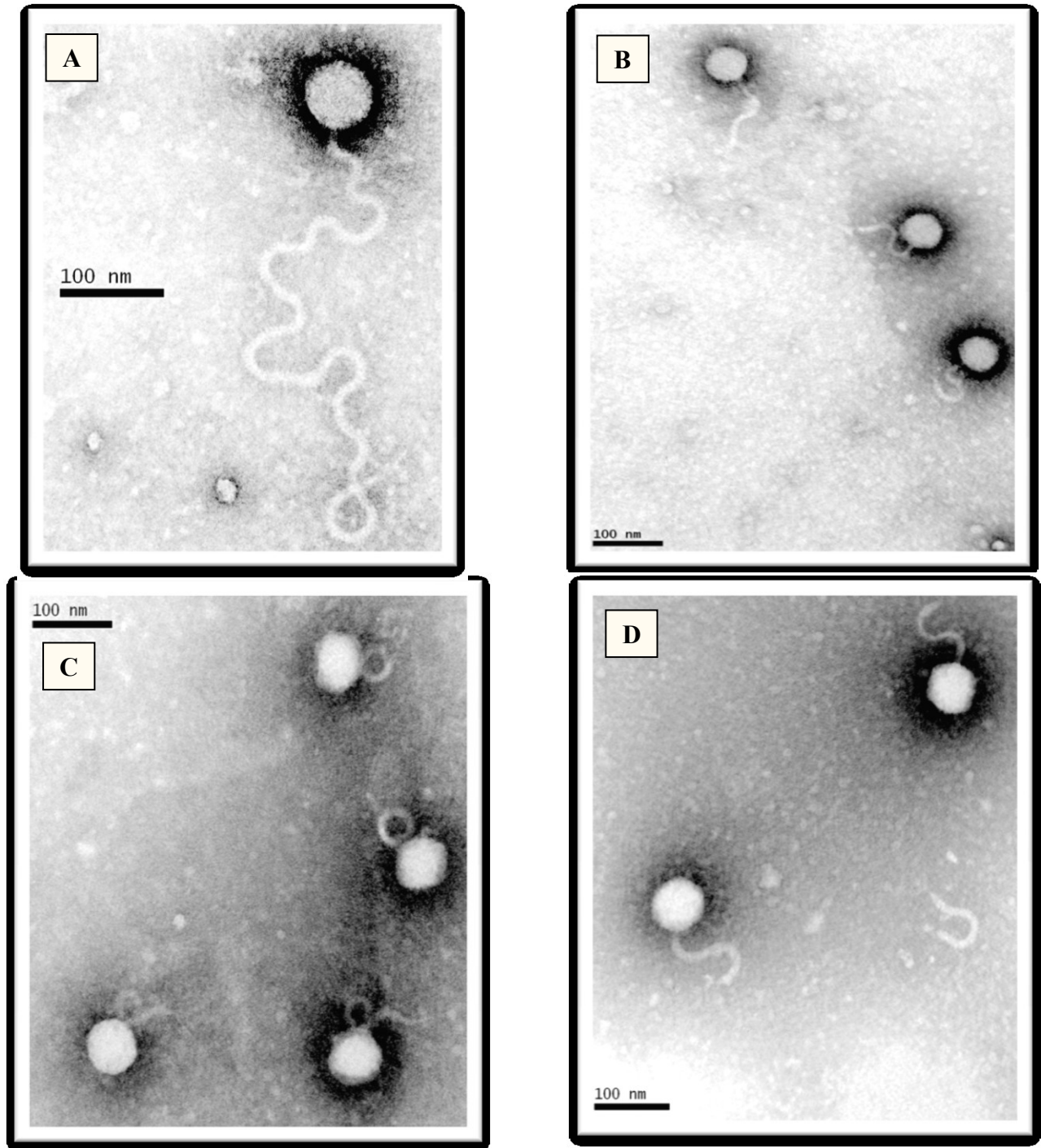


Figura 31- Microfotografia eletrônica de colifagos pertencentes à Família *Siphoviridae*.
A. Colifago 13 (tipo T1) isolado de amostras de água do mar do ponto 3 de Santos, mostrando uma cauda de 995 nm, comprimento não reportado em estudos anteriores;
B. Colifago 1 (tipo T1), isolado de água (Santos); **C.** Colifago 45 (tipo T1) com cauda em forma de anel, isolado de plâncton (São Sebastião); **D.** Colifago 47 (tipo T1), com cauda semi desenrolada isolado de plâncton de São Sebastião.

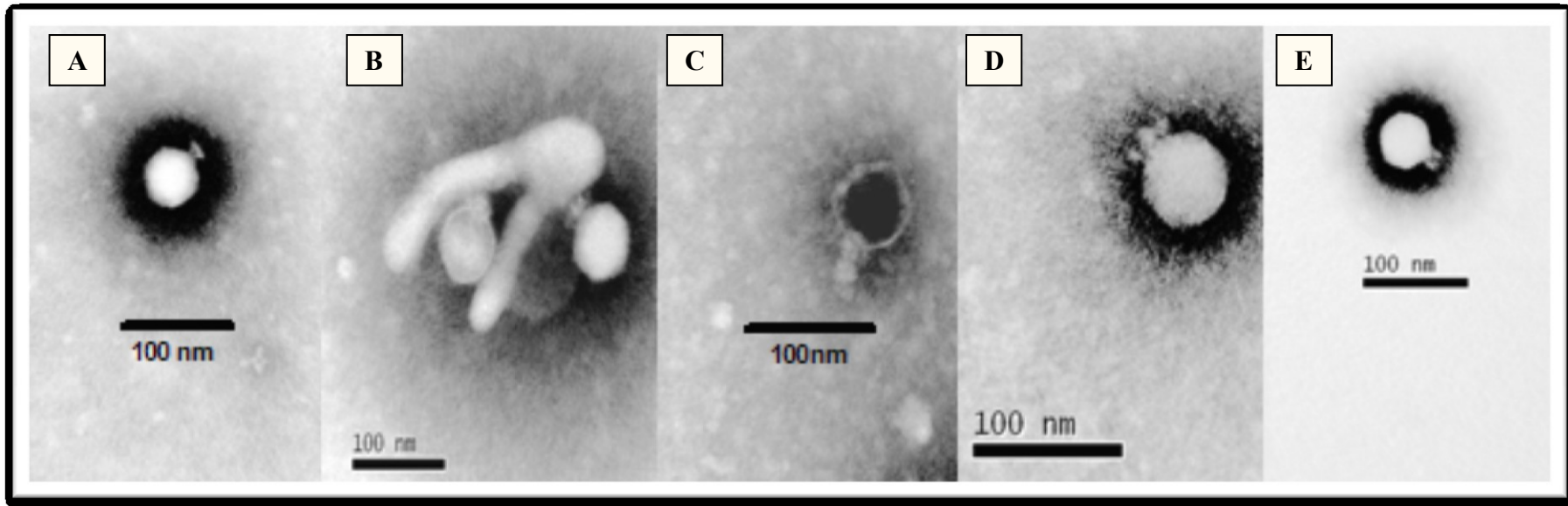


Figura 32. Microfotografia eletrônica de colifagos pertencentes à Família *Podoviridae*. **A.** Colifago 3 (tipo *sd*), isolado de água (Santos), **B.** Colifago 15 (tipo N4), isolado de água (Santos), **C.** Colifago 28 (tipo C1), isolado de água (Santos), **D.** Colifago 44 (tipo N4), isolado de plâncton (São Sebastião), **E.** Colifago 78 (tipo N4), isolado de plâncton (Santos).

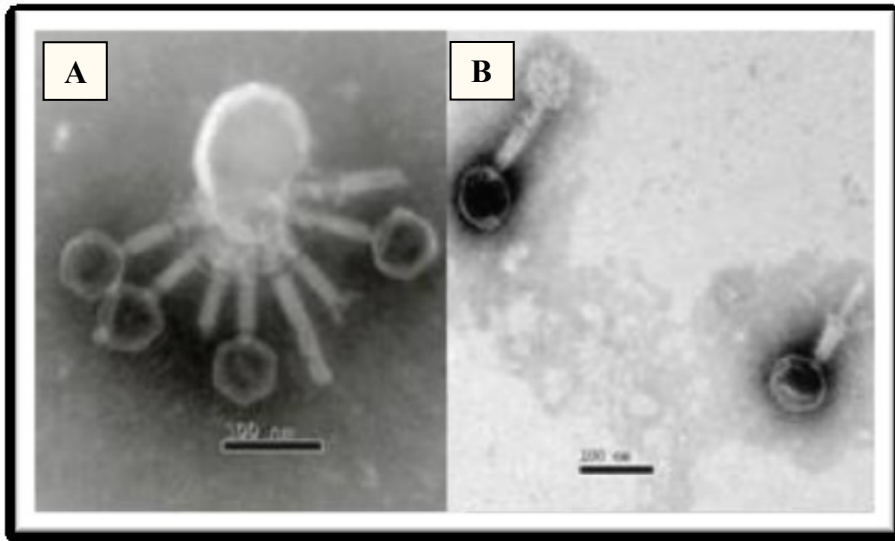


Figura 33- Microfotografia eletrônica de colifagos pertencentes à Família *Myoviridae* (tipo YerA41) isolados de amostras de Santos. **A.** Colifago 18 isolado de plâncton, **B.** Colifago 64, isolado de água do mar.

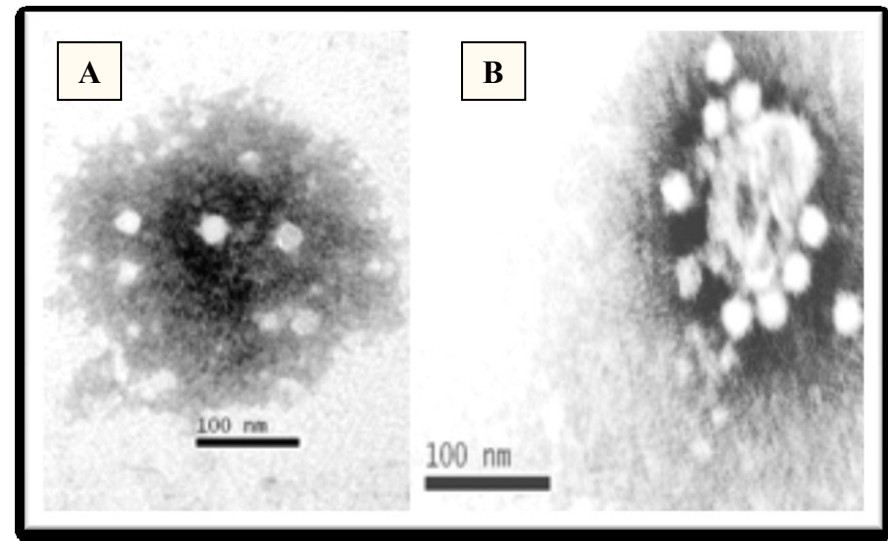


Figura 34- Microfotografia eletrônica de colifagos pertencentes à Família *Microviridae* (tipo Xφ174) isolados de plâncton (São Sebastião). **A.** Colifago 38, **B.** Colifago 42.

5.9 Caracterização molecular de fagos

O protocolo A (Sambrook *et al.*, 1989) testado nos 62 colifagos não foi eficiente, pois 80% das amostras apresentaram baixa concentração (42 a 80 ng/ μ L) e a relação de absorvância 260/280 foi menor que 1,8. Através da extração de ácido nucléico pelo protocolo B (modificação de Lockett, 1990) obtiveram-se DNAs de ótima qualidade. Suas concentrações variaram de 259,6 ng/ μ L a 853 ng/ μ L e a relação de absorvância ficou sempre entre 1,8 e 2,0.

5.9.1 Caracterização por Rep-PCR (BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR)

5.9.1.1 BOX-PCR

Dos 62 colifagos testados, 42 (68%) apresentaram o elemento BOX e os produtos obtidos variaram em seus tamanhos desde 102 pb até 2,2 Kb. Nas amostras de água do mar da Baixada Santista, observou-se uma amplificação de 63,6%. Com relação às amostras de plâncton, foi observada uma maior amplificação (78,3%) em regiões com maior poluição antrópica (Santos) e menor amplificação (33,3%), na área preservada de Ubatuba. Em São Sebastião, área de moderado impacto antropogênico, a porcentagem de amplificação foi de 63,3% nas amostras de plâncton. Já em amostras de bivalves, a presença do elemento BOX foi observada nos dois isolados (Tabela 12).

Fragmentos comuns de 577 pb e 373 pb foram observados em 50% dos isolados das diferentes famílias taxonômicas dos colifagos.

O dendrograma construído usando o coeficiente Dice permitiu observar a existência de 11 subclusters com $\geq 70\%$ de similaridade. Um subcluster com 76,9% de similaridade continha dois isolados da família *Siphoviridae* um de plâncton de São Sebastião e outro de água do mar de Santos. Outro subcluster com 80% de similaridade agrupou dois colifagos, um da família *Podoviridae* e outro da *Microviridae*, ambos de amostras de plâncton de São Sebastião. O maior subcluster observado com 81,3% de similaridade, agrupou 6 colifagos do morfotipo B1 e um colifago do morfotipo C1, sendo de água de mar e plâncton da área de Santos. Dois subclusters com 75% de similaridade foram observados. Um deles agrupou dois isolados da família *Siphoviridae* de amostras de plâncton, um de São Sebastião e outro de Santos. Outro subcluster agrupou dois isolados de Santos das famílias *Siphoviridae* (plâncton) e *Podoviridae* (água do mar). Dois colifagos (18 e 19) isolados da mesma

amostra de plâncton de Santos (Ponto 1) foram agrupados num subcluster com 70% de similaridade, um colifago era da família *Myoviridae* (18) e o outro da família *Siphoviridae* (19).

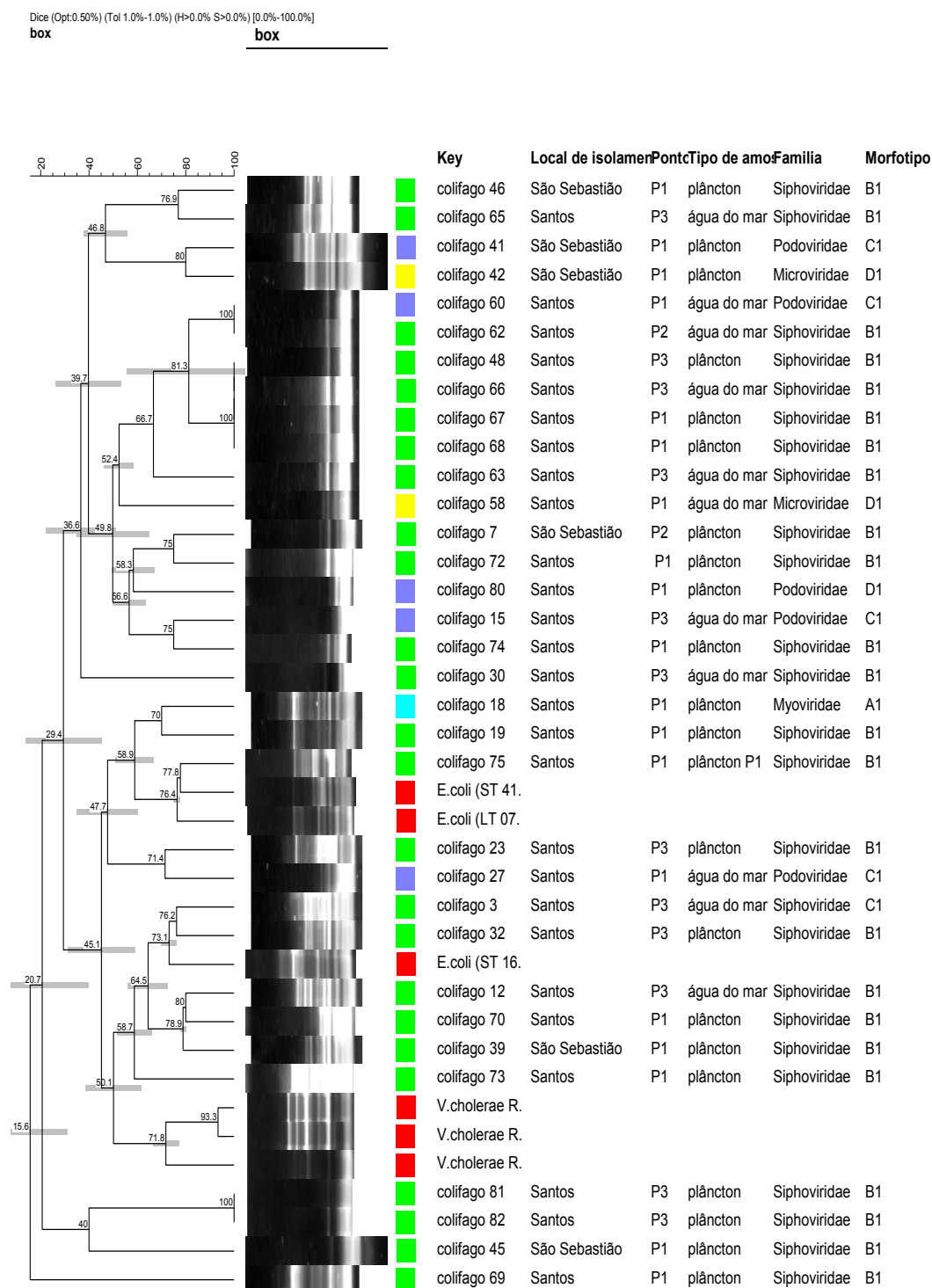


Figura 35 - Dendrograma construído com a técnica de BOX-PCR em isolados de colifagos, provenientes de amostras de água do mar, plâncton e bivalves do Canal de São Sebastião e Santos.

Legenda: ■ Cepas controle, ■ *Siphoviridae*, ■ *Myoviridae*, ■ *Podoviridae*, ■ *Microviridae*.

O colifago 75 foi associado aos controles de *E.coli* ST 4142 e *E.coli* LT 0761 num subcluster com similaridade de 76,4%. Os colifagos 23 e 27 foram agrupados num subcluster com 71,4% de similaridade, os dois são de amostras de Santos, um de plâncton e outro de água do mar respectivamente. Dois colifagos das famílias *Siphoviridae* (colifago 3 de água do mar) e *Podoviridae* (colifago 32 de plâncton) isolados do ponto 3 de Santos, agruparam-se num subcluster com 73,1% de similaridade. Os colifagos 12 (água do mar de Santos), 39 (plâncton de São Sebastião), 70 e 73 (plâncton de Santos) pertencentes à família *Siphoviridae* compartilharam um subcluster com 78,9% de homologia. 100% de similaridade foi observado nos colifagos (81 e 82) isolados de amostras de plâncton da família *Siphoviridae*.

Esta metodologia não permitiu diferenciar os colifagos por família nem pela origem, pois não existem agrupamentos em clusters definidos para os diferentes tipos de fagos.

5.9.1.2 ERIC-PCR

Um total de 62 colifagos foram testados por esta metodologia, 38,7% amplificaram seqüências comuns intergênicas repetitivas de enterobactérias. Foi observada a presença de três fragmentos comuns (2,5 Kb, 2,0 Kb e 1,2 Kb) em 19 dos 24 colifagos que amplificaram usando esta técnica de PCR (Tabela 12).

O dendrograma construído usando o coeficiente Dice mostrou cinco subclusters com mais de 70% de homologia (Figura 36). Um subcluster com 83,3% de similaridade agrupou os colifagos 1 (*Siphoviridae*) e 28 (*Podoviridae*), os dois isolados de água do mar de Santos. Os colifagos 6 (plâncton) e 5 (bivalves) isolados de Ubatuba, encontraram-se agrupados num subcluster com 100% de homologia. Um subcluster com 77,6% de similaridade reuniu 5 colifagos, três isolados de São Sebastião e dois de Santos, todos isolados de amostras de plâncton, mas caracterizados em famílias diferentes. Um quarto subcluster com 85,7% de similaridade juntou os colifagos 16 (*Microviridae*), 18 (*Myoviridae*) e 19 (*Siphoviridae*), isolados a partir de amostras de plâncton de Santos. Um quinto e último subcluster com 75% de similaridade agrupou os controles de *V.cholerae* RC.

Esta técnica também não permitiu perceber as diferenciações entre os tipos de colifagos e sua origem.

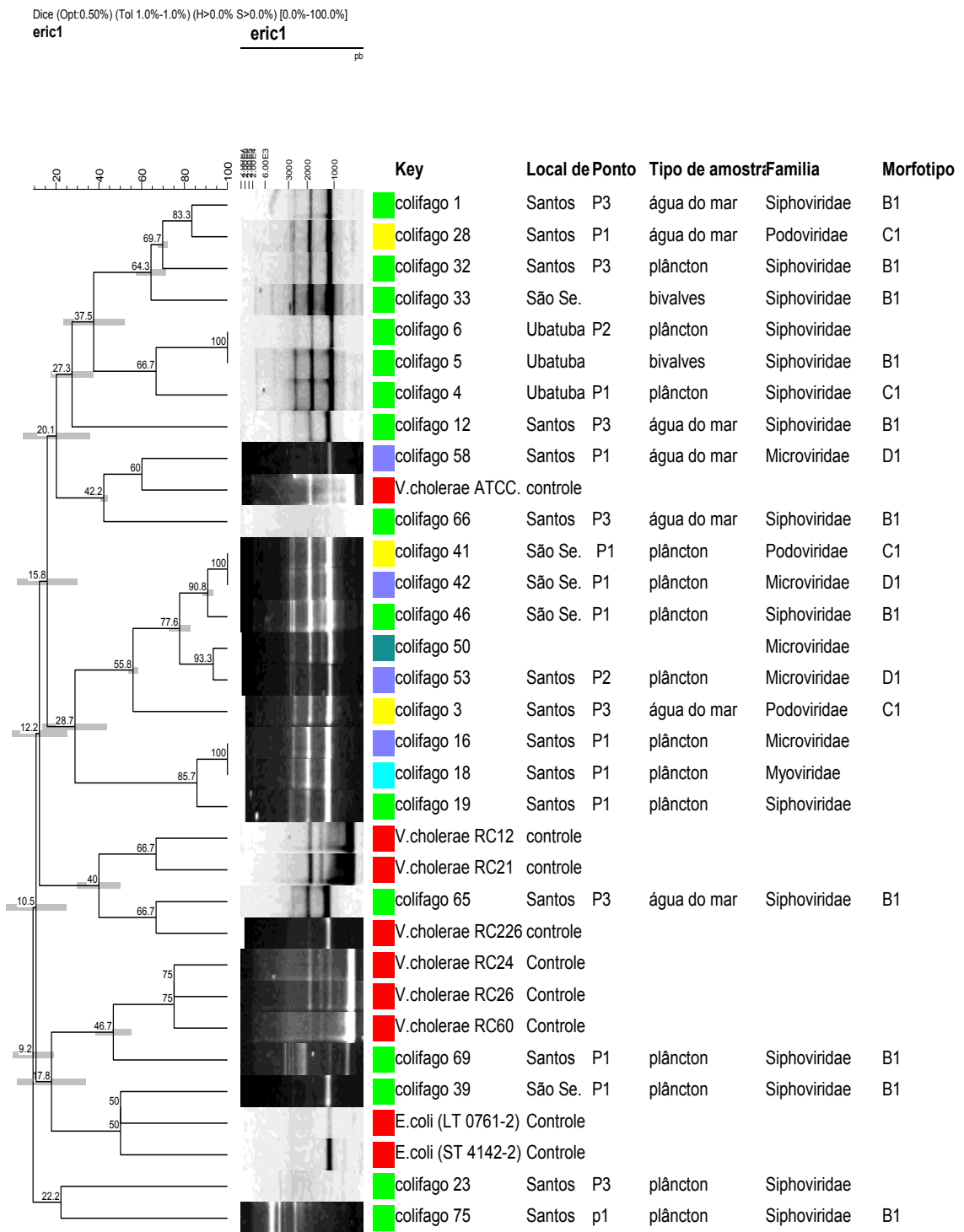


Figura 36 - Dendrograma construído com a técnica de ERIC-PCR em isolados de colifagos, provenientes de amostras de água do mar, plâncton e bivalves do Canal de São Sebastião, Santos e Ubatuba.

Legenda: ■ Cepas controle, ■ *Siphoviridae*, ■ *Myoviridae*, ■ *Podoviridae*, ■ *Podoviridae*.

5.9.1.3 REP-PCR

Dos 62 colifagos testados por esta técnica, 17 (27,4%) apresentaram seqüências REP. 50% deles, amplificaram só um fragmento de 661 pb e outros amplificaram duas bandas, uma de 637 pb e outra de 548 pb sem diferenciação de tipo nem de origem. Dos 22 colifagos isolados de água do mar, 3 (13,6%) mostraram a presença de seqüências REP. Em plâncton foram observadas as seguintes porcentagens de amplificação: 66,7% (Ubatuba), 34,8% (Santos) e 27,2% (São Sebastião) (Tabela 12). O comportamento em isolados de bivalves foi diferente, somente o isolado proveniente de São Sebastião amplificou com esta metodologia. Devido ao reduzido número de bandas geradas pela técnica não foi possível a construção do dendrograma.

5.9.2 Caracterização molecular dos colifagos isolados usando as enzimas de restrição (RFLP)

Das nove enzimas testadas, as enzimas de restrição com as melhores eficiências de corte foram: *DraI* (54,8%), *EcoRI* (40,3%), *EcoRV* (19,4%) e *BgIII* (14,5%) (Tabela 12). A enzima *Hinfi*, apesar de ter cortado os DNAs numa porcentagem de 30%, produziu muitos fragmentos pequenos, tornando difícil a visualização e a definição dos tamanhos dos mesmos.

Os resultados da análise do polimorfismo do DNA dos fagos pela digestão com a enzima de restrição *Hinfi*, revelaram que a enzima não clivou, ou clivou em baixa freqüência, o DNA dos fagos. Foi observada uma resistência de clivagem de 100% nos fagos isolados de Ubatuba e São Sebastião. Já nos colifagos isolados de Santos a freqüência de clivagem foi de 22,7%.

Tabela 12- Freqüência da clivagem do DNA de colifagos somáticos por enzima de restrição e da amplificação do DNA por rep-PCR.

Tipo de amostra	Local	Enzima de restrição					rep-PCR		
		n	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>BgIII</i>	<i>DraI</i>	BOX	ERIC	REP
Água do mar	Santos	22	10 (45,4)	3 (13,7)	2 (9,0)	12 (54,5)	14 (63,6)	8 (36,4)	3 (13,6)
	Santos	23	5 (21,7)	3 (13,0)	5 (21,7)	12 (52,2)	18 (78,3)	9 (39,1)	8 (34,8)
Plâncton	São Sebastião	12	7 (63,6)	2 (18,2)	2 (18,2)	6 (54,5)	7 (63,6)	6 (54,5)	3 (27,2)
	Ubatuba	3	2 (66,7)	3 (100,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	1 (33,3)	0 (0,0)	2 (66,7)
Bivalves	São Sebastião	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	1 (100,0)
	Ubatuba	1	1 (100)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total		62	25 (40,3)	12 (19,4)	9 (14,5)	34 (54,8)	42 (67,7)	24 (38,7)	17 (27,4)

Legenda: n: número de colifagos isolados

Após o exame em conjunto das três populações de colifagos, de águas pouco poluídas (Ubatuba), de águas moderadamente poluídas (São Sebastião), e de alta atividade antrópica (Santos) foi verificada maior eficiência de digestão pelas enzimas *DraI* e *EcoRI*, quando comparada com a enzima *HinfI*. Os fagos de ambientes aquáticos pouco poluídos tiveram maior frequência de digestão de seus DNAs. A análise da distribuição dos fragmentos, obtidos após a digestão do DNA dos colifagos com as enzimas *EcoRI* e *DraI*, não evidenciaram a presença de fragmentos comuns a todas as populações estudadas.

A análise dos fragmentos produzidos pela digestão com *EcoRI* dos fagos isolados de águas de Ubatuba, revelou um perfil C (15,2 Kb, 5,1 Kb, 4,0 Kb e 3,0 Kb) como predominante. Os isolados de São Sebastião exibiram principalmente o perfil B (14,0 Kb e 5,6 Kb) e colifagos isolados de Santos apresentaram o perfil dominante A (11,9 Kb), aparentemente DNA não digerido (Tabela 13, Figura 37).

Os colifagos pertencentes à família *Myoviridae*, cujos DNAs foram digeridos com a enzima *EcoRI*, apresentaram um fragmento comum, de tamanho de 11,9 Kb. Os perfis de restrição apresentados para cada população foram analisados pelos tamanhos dos fragmentos e não foi observado um padrão comum específico para cada grupo.

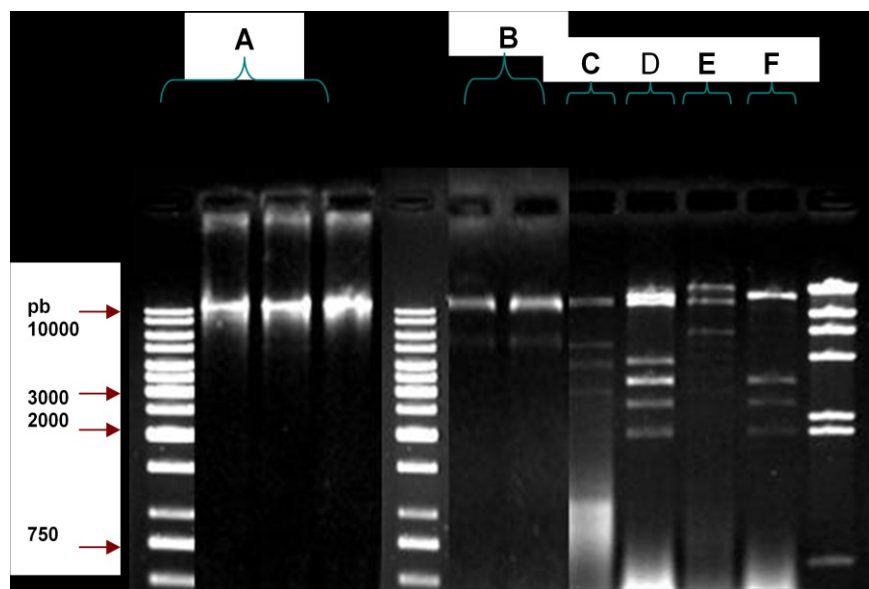


Figura 37 - RFLP com *EcoI* (Promega). Poços: 1. Marcador 1 Kb (Promega); 2-4, 6-7. Colifagos da família *Siphoviridae*; 5. Marcador 1Kb; 8-11. Colifagos da família *Podoviridae*; 12. Marcador λ *HindIII* (Promega).

Tabela 13- Perfis de digestão dos DNAs de colifagos pela enzima de restrição *EcoRI*, segundo família e área estudada.

Fonte	n	Perfil A	Perfil B	Perfil C	Perfil D	Perfil E	Perfil F	Sem Bandas
		11,9 Kb	14 Kb	15,2 Kb	18 Kb	24 Kb	19 Kb	
			5,6 Kb	5,1 Kb	4,1 Kb	15 Kb	3,3 Kb	
				4,0 Kb	3,4 Kb	6,3 Kb	2,7 Kb	
				3,0Kb	2,6 Kb	3,0 Kb	2,0 Kb	
					2,0 Kb			
Ubatuba								
<i>Siphoviridae</i>	3			2				1
<i>Podoviridae</i>	1		1					0
<i>Microviridae</i>	0							
<i>Myoviridae</i>	0							
Sao Sebastião								
<i>Siphoviridae</i>	7		4					3
<i>Podoviridae</i>	2			1				1
<i>Microviridae</i>	4		2					2
<i>Myoviridae</i>	0							
Santos								
<i>Siphoviridae</i>	28	22	2		1			3
<i>Podoviridae</i>	11	3	0	2	1	3	1	1
<i>Microviridae</i>	4	0	1	0	1			2
<i>Myoviridae</i>	2	2						0
Total	62	27	10	5	3	3	1	13
	(100%)	(43,55)	(16,13%)	(8,06%)	(4,84%)	(4,84%)	(1,61%)	(20,97%)

O dendrograma construído usando os fragmentos cortados com a enzima *DraI* (maior frequência de digestão) evidenciou a presença de 9 subclusters com $\geq 70\%$ de similaridade. Num subcluster com 76% de homologia foram agrupados três colifagos da família *Siphoviridae* de amostras de Santos, dois foram isolados de plâncton (70, 72) e outro isolado de água do mar (63). Outro subcluster com 93,3% de similaridade agrupou os colifagos 68 e 69, ambos os isolados de amostras de plâncton de Santos e correspondentes à família *Siphoviridae*.

Um subcluster com 81,2% de similaridade agrupou três colifagos de famílias diferentes, colifago 4 (*Podoviridae*), isolado de plâncton de Ubatuba; colifago 64 (*Myoviridae*), isolado de água do mar de Santos; colifago 76 (*Siphoviridae*) isolado de amostras de plâncton de Santos. Os colifagos 31 (plâncton) e 32 (água do mar) isolados de amostras de Santos e pertencentes à família *Siphoviridae* foram agrupados num subcluster com 80% de similaridade. Um subcluster com 87,5% de homologia agrupou os colifagos 14 (*Siphoviridae*) e 60 (*Podoviridae*) ambos isolados de água do mar de Santos. Os colifagos

59 (*Microviridae*-Santos) e 6 (*Siphoviridae*-Ubatuba) isolados a partir de amostras de plâncton foram agrupados num subcluster com 85,7% de similaridade. Os colifagos 12 (Santos-água do mar) e 8 (São Sebastião-plâncton) pertencentes à família *Siphoviridae* compartilham uma similaridade de 78,3%.

O maior subcluster com 71,4% de similaridade reuniu cinco colifagos, quatro da família *Siphoviridae* e um da família *Microviridae* isolados de amostras de plâncton (São Sebastião, Santos e Ubatuba) e bivalves (São Sebastião). Finalmente, um subcluster com 88,9% de similaridade foi observado agrupando os colifagos 27 (*Podoviridae*) e 30 (*Siphoviridae*) isolados a partir de amostra de água do mar de Santos.

Colifagos de diferentes famílias foram agrupados no mesmo cluster, mas clusters com mais de 90% de similaridade sempre foram formados por colifagos da mesma família (Figura 38).

O tamanho dos colifagos de acordo com os tamanhos dos fragmentos gerados pela enzima *DraI*, variou de 24,4 Kb a 51 Kb na família *Siphoviridae*, de 17,7 Kb a 44,6 Kb na família *Podoviridae*, de 33,1 a 55,5 Kb na família *Microviridae*, e de 19 a 30,3 Kb na família *Myoviridae* (Tabela 14).

Já, comparando-se as três populações de colifagos isolados nesta pesquisa (ambientes aquáticos pouco poluídos, moderadamente poluídos e ambientes aquáticos com elevado grau de poluição) foram verificados comportamentos diferentes quanto à frequência de digestão pelas enzimas utilizadas e também quanto ao número de fragmentos produzidos.

DRA DICE CERTO (37 entries)

Dice (Opt:0.50%) (Tol:1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

DraI

DraI

pb

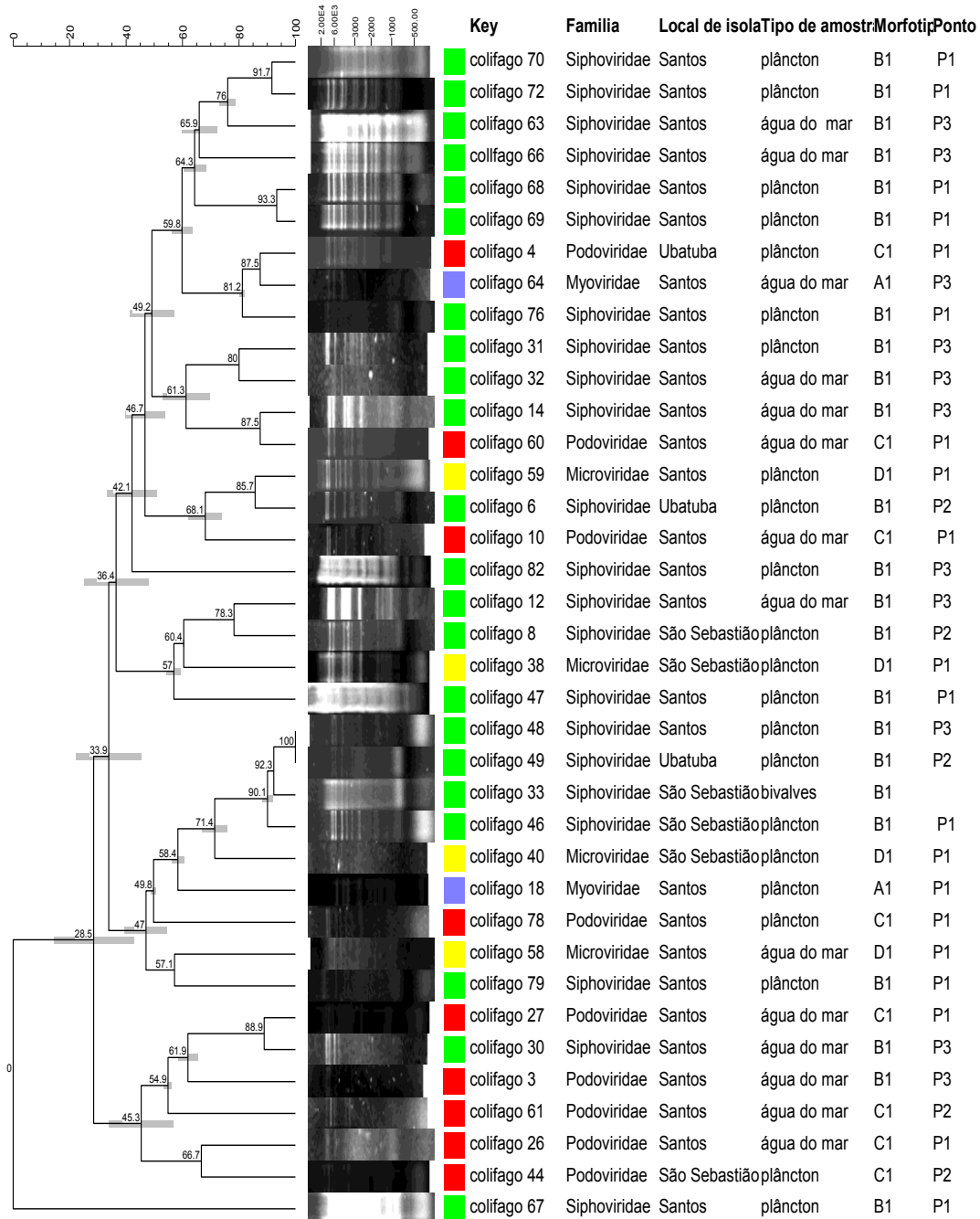


Figura 38 - Dendrograma construído com a técnica RFLP, usando a enzima *DraI* em isolados de colifagos, provenientes de amostras de água do mar, plâncton e bivalves do Canal de São Sebastião, Santos e Ubatuba.

Legenda: ■ *Podoviridae* ■ *Siphoviridae* ■ *Myoviridae* ■ *Microviridae*.

Tabela 14- Estimativa do tamanho de colifagos somáticos determinado pelo corte a enzima *DraI*, por família e por fonte de isolamento.

Isolado	Fragmentos (Kb)	Tamanho			Tipo	Fonte de isolamento
		total (Kb)	Família	Morfotipo		
Colifago 31	11; 8,7; 5,4; 4,1; 3,7; 3,5; 3,1; 2,8; 2,4; 2,2; 2,1; 1,9	51	<i>Siphoviridae</i>	B1	Vi II	S-PL-P3
Colifago 63	9,1; 6,9; 4,9; 3,9; 3,6; 3,0; 2,7; 2,5; 2,2; 1,9; 1,7; 1,2; 0,9	44,5	<i>Siphoviridae</i>	B1	T1	S-AM-P3
Colifago 6	11; 8,8; 5,3; 3,7; 3,3; 3,1; 2,4; 2,2; 1,8; 1,7	43,3	<i>Siphoviridae</i>	B1	T1	U-PL-P2
Colifago 32	11; 9,3; 5,4; 4,2; 3,7; 3,5; 3,1; 2,7	43	<i>Siphoviridae</i>	B1	Vi II	S-AM-P3
Colifago 12	8,0; 5,8; 3,8; 3,7; 3,4; 2,5; 1,7; 1,5; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,5	34,5	<i>Siphoviridae</i>	B1	T1	S-AM-P3
Colifago 30	11; 8,2; 5,4; 4,3	28,9	<i>Siphoviridae</i>	B1	T1	S-AM-P3
Colifago 46	6,7; 5,1; 3,9; 3,6; 3,2; 2,5; 1,8	26,8	<i>Siphoviridae</i>	B1	T1	S.S.-PL-P1
Colifago 14	8,0; 6,0; 3,7; 3,5; 3,1; 2,4 1,8; 0,9	29,4	<i>Siphoviridae</i>	B1	Vi II	S-AM-P3
Colifago 47	6,9; 4,2; 3,4; 2,7; 1,7; 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6	23,9	<i>Siphoviridae</i>	B1	T1	S-PL-P1
Colifago 49	6,6; 4,9; 3,8; 3,6; 3,1; 2,6	24,6	<i>Siphoviridae</i>	B1	T1	U-PL-P2
Colifago 33	6,6; 4,9; 3,8; 3,6; 3,2; 2,5; 1,7	26,3	<i>Siphoviridae</i>	B1	Vi II	S.S.-BV
Colifago 48	6,3; 5,0; 3,8; 3,6; 3,1; 2,6	24,4	<i>Siphoviridae</i>	B1	T1	S-PL-P3
Colifago 4	10; 8,1; 6,0; 4,8; 3,9; 3,7; 3,0; 2,8; 2,3	44,6	<i>Podoviridae</i>	C1	sd	U-PL-P1
Colifago 44	16; 8,5; 6,4; 4,2; 3,7; 3,5	42,3	<i>Podoviridae</i>	C1	N4	S.S.-PL-P2
Colifago 10	9,6; 7,5; 4,9; 3,7; 2,9; 2,6; 2,4; 2,1; 1,9; 1,7	39,3	<i>Podoviridae</i>	C1	sd	S-AM-P1
Colifago 60	8,6; 5,6; 3,7; 3,5; 3,2; 2,7; 2,4; 1,8	31,5	<i>Podoviridae</i>	C1	N4	S-AM-P1
Colifago 26	14; 9,0; 5,7	28,7	<i>Podoviridae</i>	C1	N4	S-AM-P1
Colifago 27	11; 8,4; 6,0; 4,1; 3,7	33,2	<i>Podoviridae</i>	C1	T1	S-AM-P1
Colifago 61	10; 7,0; 5,5; 4,5; 3,6; 3,4	34	<i>Podoviridae</i>	C1	N4	S-AM-P2
Colifago 3	10; 7,7	17,7	<i>Podoviridae</i>	B1	sd	S-AM-P3
Colifago 58	17; 11; 6,6; 5,0; 3,9; 3,7; 3,2; 2,7; 2,4	55,5	<i>Microviridae</i>	D1	φX174	S-AM-P1
Colifago 59	14; 10; 8,0; 4,9; 4,1; 3,7; 3,3; 2,4; 2,2; 1,8; 1,7	56,1	<i>Microviridae</i>	D1	φX174	S-PL-P1
Colifago 38	8,2; 6,0; 4,0; 3,5; 3,2; 2,7; 1,7; 1,5; 1,3; 1,0	33,1	<i>Microviridae</i>	D1	φX174	S.S.-PL-P1
Colifago 40	6,9; 5,1; 3,8; 3,5	19,3	<i>Microviridae</i>	D1	φX174	S.S.-PL-P1
Colifago 64	8,8; 5,8; 3,9; 3,7; 3,0; 2,8; 2,3	30,3	<i>Myoviridae</i>	A1	YerA41	S-AM-P3
Colifago 18	4,8; 3,7; 3,5; 2,6; 1,8; 1,6; 1,0	19	<i>Myoviridae</i>	A1	YerA41	S-PL-P1

Legenda: S-AM-P1 (amostra de água do mar de Santos-ponto 1), S-AM-P2 (amostra de água do mar de Santos-ponto 2), S-AM-P3 (amostra de água do mar de Santos-ponto 3), S-PL-P1 (amostra de plâncton de Santos-ponto 1), S-PL-P2 (amostra de plâncton de Santos-ponto 2), S-PL-P3 (amostra de plâncton de Santos-ponto 3), S.S.-PL-P1 (amostra de plâncton de São Sebastião-ponto 1), S.S.-PL-P2 (amostra de plâncton de São Sebastião-ponto 2), U-PL-P1 (amostra de plâncton de Ubatuba-ponto 1), U-PL-P2 (amostra de plâncton de Ubatuba-ponto 2), S.S.-BV (amostra de bivalves de São Sebastião).

Para observar a significância da diferenciação dos colifagos pelas metodologias moleculares foram postuladas duas hipóteses:

-Hipótese H0: as enzimas de restrição e as metodologias de rep-PCR não diferenciam os colifagos por família, tipo de amostra e local.

-Hipótese alternativa: existe diferenciação dos colifagos com as técnicas empregadas.

O teste Qui quadrado (χ^2) de Pearson permitiu observar que 30,2% dos colifagos que não eram da família *Podoviridae* apresentaram o sítio de restrição para a enzima *EcoRI* quando comparado ao 71,4% que eram da família *Podoviridae* e que foram digeridos pela enzima, houve diferenças significantes ($p= 0,06$) (Figura 39A). Analisando os dados por local e família, foi encontrado um $p= 0,035$ para os colifagos *Podoviridae* isolados de São Sebastião e digeridos com a enzima *EcoRV*.

59,1% dos colifagos que não eram da família *Siphoviridae* apresentaram o sítio de restrição para a enzima *EcoRI* quando comparado a 14,3% que eram da família *Siphoviridae* e que foram digeridos pela enzima, houveram diferenças significantes ($p= 0,022$) (Figura 39B).

Quando os dados foram analisados por local, morfotipo e enzima de restrição, encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre o morfotipo C1 dos colifagos isolados de Santos e Ubatuba e as enzimas *EcoRI* e *EcoRV*. Colifagos C1 isolados de Santos e digeridos com a enzima *EcoRI* ($p= 0,002$) e os isolados de Ubatuba ($p= 0,046$). Houve diferenças significantes ($p= 0,035$) quando comparada a porcentagem (11,1%) de colifagos do morfotipo C1 isolados de São Sebastião digeridos com a enzima *EcoRV* com a 100% dos colifagos de morfotipos não C1 cortados com a enzima *EcoRV*.

61,1% dos colifagos de Santos que não eram do morfotipo B1 apresentaram o sítio de restrição para a enzima *EcoRI*, quando comparado a 16,6% dos colifagos do morfotipo B1 de Santos que foram cortados pela enzima. Houve diferenças estatisticamente significantes $p=0,02$ (Figura 39B).

50% dos colifagos de São Sebastião que não eram do morfotipo B1 apresentaram o sítio de restrição para a enzima *EcoRV* quando comparado a 0% dos colifagos que eram B1 e que foram cortados com a enzima *EcoRV* ($p= 0,05$).

Os colifagos de morfotipo B1 isolados de Ubatuba, apresentaram o sítio de restrição para a enzima *EcoRI* numa porcentagem de 100%. Quando analisada a significância estatística foi encontrado um valor p de 0,046, mostrando a existência de diferenciação da enzima pelo colifago do morfotipo B1 isolado de um ambiente mais preservado.

Encontraram-se diferenças significantes ($p= 0,05$) quando comparada a porcentagem de colifagos que não eram da família *Siphoviridae* e que amplificaram com a técnica de REP-PCR (36,4%), quando comparada à porcentagem de isolados da família *Siphoviridae* que amplificaram com esta metodologia.

Com relação às famílias *Myoviridae* e *Microviridae* não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quando tratadas com as enzimas de restrição e rep-PCR.

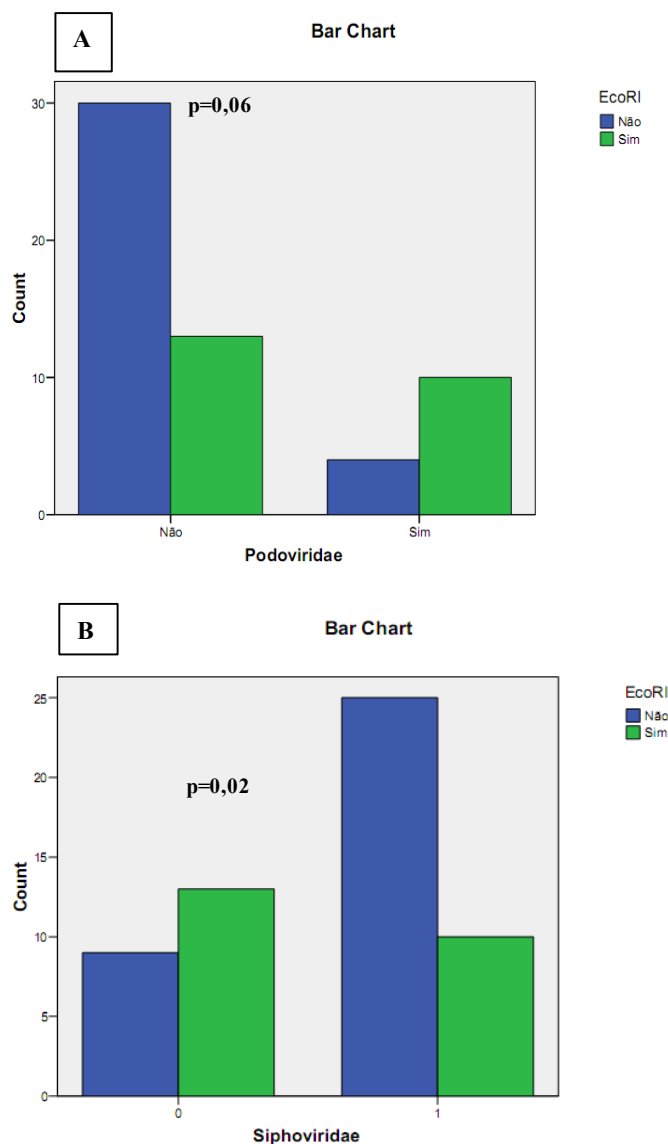


Figura 39- Diferenças estatisticamente significantes encontradas pelo método Chi² Pearson nos colifagos testados com enzimas de restrição e rep-PCR.

A. Colifagos da Família *Podoviridae* cortados com a enzima *EcoRI*, comparados com os colifagos de outras famílias que tiveram o sítio de restrição para esta enzima; **B.** Colifagos da Família *Siphoviridae* cortados com a enzima *EcoRI*, comparados com os colifagos de outras famílias que tiveram o sítio de restrição para esta enzima.

5.10 Detecção dos genes que codificam para LT, ST, CTX e TCP

Dos 62 colifagos submetidos às 4 reações de PCR, nenhum deles evidenciou a presença dos genes *ctxA* e *tcpA* associados aos fatores de virulência da toxina colérica e da toxina correguladora do pilus, respectivamente. Seis colifagos (3, 10, 11, 15, 30, 81) isolados de água do mar de Santos e pertencentes à família *Siphoviridae* (tipo T1) e *Podoviridae* (tipo *sd* e *N4*), apresentaram LT e/ou ST (Figura 40).

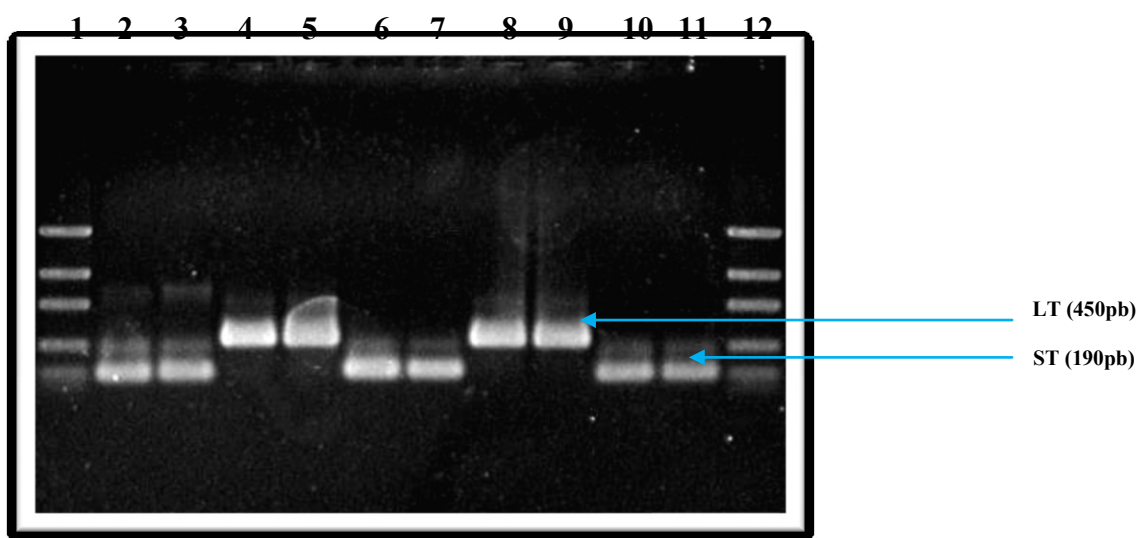


Figura 40- PCR para a detecção de LT/ST em colifagos. Poços: 1 e 12. Marcador low DNA mass ladder (Invitrogen); 2 e 3. Controle *E. coli* ST4142; 4 e 5. Controle *E. coli* LT0761-2; 6 e 7. Colifago 3 (*Podoviridae*, isolado de água do mar de Santos); 8 e 9. Colifago 81 (*Siphoviridae*, isolado de plâncton de Santos); 10 e 11. colifago 30 (*Siphoviridae*, isolado de água do mar de Santos).

5.11 Seqüenciamento dos colifagos que apresentaram fatores associados à virulência

O seqüenciamento dos fragmentos dos colifagos amplificados com primers que detectam as toxinas ST e LT de *E. coli*, permitiu elucidar a homologia genética existente entre as toxinas dos colifagos e as publicadas no *GenBank* do BLAST. Na tabela 15 estão sendo mostradas as maiores similaridades genéticas encontradas das seqüências das toxinas dos fagos com as toxinas de *E. coli* e de *V. cholerae*. Estes resultados confirmam uma alta homologia (82-85%) das toxinas LT, ST e CTX, demonstrando um antecessor evolutivo em comum (Figura 41). Uma árvore filogenética foi construída usando as seqüências encontradas na base de dados do *GenBank* e utilizando o método UPGMA com uma diferença máxima de 0,05 entre seqüências e uma longitude de brânquia de 0,97 (Figura 41). O programa usado para elaborar o cladograma foi o Mega versão 4.0.

Tabela 15- Similaridade dos colifagos somáticos contendo genes homólogos às toxinas ST e LT de acordo ao seqüenciamento.

Isolado	Seqüenciamento	Número de acesso	Score Máximo	Cobertura	Valor e	Similaridade
Colifago 3 (ST)	<i>Escherichia coli</i> E24377A	CP000795.1	396	100%	3e-107	100%
	<i>Escherichia coli</i> 195, enterotoxina A	EF057802.1	396	100%	3e-107	100%
	<i>Escherichia coli</i> Eco412, enterotoxina	DQ778054.1	396	100%	3e-107	100%
	Subunidade A da enterotoxina LT	S60731.1	396	100%	3e-107	100%
	<i>E. coli</i> gene <i>eltA</i>	V00275.1	325	100%	4e-86	93%
	<i>Vibrio cholerae</i> MTCC 3906, gene <i>ctxA</i>	EU487781.1	221	99%	1e-54	82%
	Vibriófago CTX, gene <i>rstA2</i> , gene <i>rstB2</i> , gene <i>orfU</i> , gene <i>ctxA</i> , gene <i>ctxB</i>	AF414369.2	221	99%	1e-54	82%
Colifago 15 (ST)	<i>Escherichia coli</i> 195, enterotoxina A	EF057802.1	320	100%	2e-84	95%
	<i>Escherichia coli</i> Eco412	DQ778054.1	320	100%	2e-84	95%
	Enterotoxina LT	S60731.1	320	100%	2e-84	95%
	<i>E. coli</i> <i>toxA</i>	K01995.1	320	100%	2e-84	95%
	Vibriófago CTX, gene <i>rstA2</i> , gene <i>rstB2</i> , gene <i>orfU</i> , gene <i>ctxA</i> , gene <i>ctxB</i>	AB449339.1	194	81%	2e-46	85%
Colifago 11 (LT)	<i>E. coli</i> <i>toxA</i>	K01995.1	365	100%	4e-98	98%
	<i>Escherichia coli</i> genes <i>lt</i>	AB011677.1	361	100%	5e-97	98%
	Vibriófago CTX, gene <i>rstA2</i> , gene <i>rstB2</i> , gene <i>orfU</i> , gene <i>ctxA</i> , gene <i>ctxB</i>	AB449339.1	214	95%	2e-52	84%
	<i>Vibrio cholerae</i> MTCC 3906, gene <i>ctxA</i>	EU487781.1	214	95%	2e-52	84%
	Vibriófago, genes <i>ctxA</i> , <i>ctxB</i>	AB378082.1	214	95%	2e-52	84%
Colifago 11 (ST)	<i>Escherichia coli</i> , enterotoxina A	EF057802.1	356	96%	2e-95	97%
	<i>Escherichia coli</i> Eco412	DQ778054.1	356	96%	2e-95	97%
	<i>Escherichia coli</i> , enterotoxina ST	AF242417.1	356	96%	2e-95	97%
	<i>Vibrio cholerae</i> MTCC 3906 CtxA (<i>ctxA</i>)	EU487781.1	190	96%	2e-45	80%
	Vibriófago CTX, gene <i>rstA2</i> , gene <i>rstB2</i> , gene <i>orfU</i> , gene <i>ctxA</i> , gene <i>ctxB</i>	AF542089.2	190	96%	2e-45	80%
Colifago 10 (ST)	<i>Escherichia coli</i> 195	EF057802.1	376	100%	2e-101	99%
	<i>Escherichia coli</i> Eco412 enterotoxina A	DQ778054.1	376	100%	2e-101	99%
	<i>E. coli</i> gene <i>toxA</i>	K01995.1	376	100%	2e-101	99%
	<i>Vibrio cholerae</i> MTCC 3906 CtxA (<i>ctxA</i>)	EU487781.1	208	100%	7e-51	82%
	Vibriófago CTX, gene <i>rstA2</i> , gene <i>rstB2</i> , gene <i>orfU</i> , gene <i>ctxA</i> , gene <i>ctxB</i>	AF542089.2	208	100%	7e-51	82%
Colifago 81 (LT)	<i>Escherichia coli</i> 195, enterotoxina A	EF057802.1	379	100%	2e-102	99%
	<i>Escherichia coli</i> Eco412 enterotoxina A termo-lável	DQ778054.1	379	100%	2e-102	99%
	<i>Vibrio cholerae</i> MTCC 3906 CtxA, gene <i>ctxA</i>	EU487781.1	208	99%	7e-51	82%
	<i>Vibrio cholerae</i> 0395	CP000627.1	208	99%	7e-51	82%
	<i>Vibrio cholerae</i> F gene (<i>ctxA</i>)	AY376268.1	208	99%	7e-51	82%
Colifago 30 (LT)	<i>Escherichia coli</i> 195	EF057802.1	361	100%	5e-97	98%
	<i>Escherichia coli</i> Eco412	DQ778054.1	361	100%	5e-97	98%
	Vibriófago CTX, genes <i>ctxA</i> , <i>ctxB</i> , <i>rtxA</i>	AB449339.1	210	95%	2e-51	83%
	<i>Vibrio cholerae</i> MTCC 3906, gene <i>ctxA</i>	EU487781.1	210	95%	2e-51	83%

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização físico-química e microbiológica da região costeira de São Paulo

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 das 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 na qualidade da água do mar. As chuvas podem carregar águas paradas com esgoto e água de pequenos córregos que recebem esgotos clandestinos. Esgoto, lixo e outros detritos, na ocorrência de chuvas, são carreados 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.

Com relação às águas marinhas, a região do litoral paulista como um todo é caracterizada pela ação de duas 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.

Durante o ano, a região do Canal de São Sebastião, o litoral de Ubatuba e a Baía de Santos sofrem influência de três tipos de massas de água (Água Costeira – AC, Água Tropical – AT e Água Central do Atlântico Sul – ACAS), as quais influenciam os níveis de salinidade e temperatura da água. No entanto, em relação às massas de água superficiais, estas possuem características termohalinas estreitamente relacionadas com a radiação solar, temperatura do ar e com o índice de pluviosidade da região.

Os valores de salinidade e temperatura obtidos no Canal de São Sebastião, durante os vinte meses de coleta de amostras foram próximos aos valores encontrados em Ubatuba, entretanto foram maiores que os valores encontrados na Baía de Santos para o mesmo período de coleta. Essa variação pode ser explicada pelo índice de pluviosidade da região, pois a

Baixada Santista possui a maior média pluviométrica do litoral, durante o ano inteiro, o que aumenta o aporte de água doce dentro da Baía.

De uma forma geral, levando-se em conta as médias aritméticas dos valores de salinidade, São Sebastião e Ubatuba foram classificados como locais de água salinas e, Santos, classificado como local de águas salobras, de acordo com a resolução CONAMA 357/05.

Embora seja bem documentado que a contaminação microbiológica das águas costeiras constitui um risco para a saúde humana através da exposição nas águas de recreação e do consumo de frutos marinhos, a fonte da contaminação pode desempenhar um papel na determinação do nível de risco real. Normas e protocolos têm sido estabelecidos para assegurar a qualidade microbiológica de águas para fins de recreação e cultivo de produtos marinhos [United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1986)]. Cada um dos indicadores microbiológicos tem vantagens e desvantagens, e o desafio é selecionar o indicador adequado, ou a combinação de indicadores, para uma finalidade específica de avaliação da qualidade das águas (OMS, 2000). Indicadores microbiológicos como os coliformes termotolerantes, *E.coli*, enterococos intestinais e colifagos somáticos, têm sido utilizados mundialmente para verificar a contaminação fecal dos corpos de água, indicando assim a presença de bactérias patogênicas, que são uma ameaça à saúde pública e ambiental (VON SPERLING, 1996; SHIBATA *et al.*, 2004).

A qualidade microbiológica de amostras de água do mar do Canal de São Sebastião, Ubatuba e Baía de Santos foi verificada utilizando indicadores de contaminação fecal com o objetivo de caracterizar os três ambientes quanto ao nível de impacto antropogênico presente em cada região.

Segundo os critérios estabelecidos na Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 274/2000, densidades de coliformes termotolerantes, *E.coli* e enterococos intestinais superiores a 1000 UFC/100 mL, 800 UFC/100 mL e 100 UFC/100 mL, respectivamente, em duas ou mais amostras de um conjunto de análises realizadas em cinco semanas consecutivas caracterizam a impropriedade de uma praia para recreação de contato primário (balneabilidade). Apesar das coletas de amostras nesse trabalho, não terem sido feitas semanalmente e sim mensalmente, os resultados das amostras foram avaliados como indicativas de contaminação pontual.

As amostras de água coletadas no Canal de São Sebastião e Ubatuba apresentaram contagens de coliformes termotolerantes, *E.coli* e enterococos intestinais abaixo dos valores estabelecidos, mostrando assim que o nível de impacto antropogênico é baixo nesses dois

locais, o que é confirmado, ao comparar os resultados obtidos nesse trabalho, com dados de balneabilidade da CETESB que mostrou que as praias próximas aos nossos pontos de coleta permaneceram próprias para atividades de recreação primária durante todo o ano de 2006 e 2007 (CETESB, 2008).

Na Baía de Santos, nos pontos 01 e 03 foram encontradas as maiores contagens dos indicadores de contaminação fecal em comparação com os outros dois ambientes estudados, principalmente nos meses de fevereiro e março de 2006, onde as contagens de coliformes termotolerantes, *E.coli*, colifagos somáticos e enterococos intestinais chegaram a $8,4 \times 10^3$ UFC/100 mL; $9,1 \times 10^2$ UFC/100 mL, $3,4 \times 10^3$ UFP/100 mL e $4,9 \times 10^1$ UFC/100 mL, respectivamente, ficando acima dos valores estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 274/2000. Isto não aconteceu em 100% das amostras coletadas no Ponto 02 da Baía de Santos, área usada para o cultivo de frutos do mar. Os valores encontrados para os indicadores de contaminação fecal analisados ficaram abaixo dos valores estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 274/2000, indicando que esse local apresenta menores índices de impacto antropogênico. Dados da CETESB mostraram que em 2006 e 2007, 54% e 60%, respectivamente, das praias de Santos tiveram classificação anual “Ruim” para balneabilidade (CETESB, 2008).

A poluição presente na Baía de Santos (pontos 1 e 3) é causada, principalmente, pelas atividades no porto de Santos, pelas indústrias da região de Cubatão e pelos esgotos domésticos liberados no estuário, o que explica os altos valores de indicadores de contaminação fecal encontrados nesse estudo em comparação com o Canal de São Sebastião e Ubatuba.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, foi possível classificar a Baía de Santos, o Canal de São Sebastião e Ubatuba, como ambientes de alto, médio e baixo impacto antropogênico, respectivamente.

O estudo dos indicadores de contaminação fecal é importante para subsidiar na gestão do risco à saúde humana e preservação dos ecossistemas aquáticos.

Águas recreacionais são águas doces, salobras e salinas destinadas a recreação de contato primário (balneabilidade), 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 aquele associado a atividades em que o contato com água é esporádico ou acidental e a possibilidade de ingerir quantidades apreciáveis de água é pequena, como na pesca e na navegação.

Os ambientes 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).

Do ponto de vista da saúde pública, é importante considerar não apenas a possibilidade de transmissão de doenças de veiculação hídrica aos banhistas, como também a ocorrência de organismos patogênicos oportunistas, responsáveis por dermatoses e outras infecções como conjuntivite, otite e doenças das vias respiratórias. Fatores circunstanciais, tais como a incidência de surtos epidêmicos de doenças pelo consumo de alimentos de origem aquático, derrame acidental de petróleo, ocorrência de maré vermelha ou floração de algas tóxicas poderão tornar, temporariamente, uma região do litoral imprópria para a recreação de contato primário.

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 de águas locais e pela disposição de resíduos sólidos, derrames de óleos significativos que, apesar de freqüentes, afetam principalmente à 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 impacto econômico global da contaminação do ambiente marinho, do consumo de frutos de mar ou o seu uso recreacional, em termos de enfermidades humanas, saúde debilitada e perda de qualidade de vida, pode ser de aproximadamente US\$ 13 bilhões (UNITED NATIONS, 2008). Segundo o resultado 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).

O surgimento de epidemias pode ser favorecido por mudanças nas condições ambientais. Dentro delas podemos mencionar as condições da variabilidade climática e da atividade antropogênica crônica, principalmente pela diminuição da resistência do hospedeiro

e pelo favorecimento na transmissão de determinados patógenos (GRIMES, 1991; HARVELL *et al.*, 1999).

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 alimentar e aos problemas na qualidade das águas costeiras (ROSE *et al.*, 2001).

Nesta pesquisa foi observado que, independente da atividade antrópica e do ambiente costeiro analisado, em todas as amostras foram detectadas bactérias da família *Vibrionaceae*. Concentrações maiores em uma escala logarítmica foram obtidas em amostras coletadas em Santos (litoral Sul). Não foi observada nenhuma relação entre a presença de *Vibrio* spp. e poluição fecal. 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 (COLWELL *et al.*, 1977; MARTINS, 1988; COLWELL e HUQ, 1994; MATTÉ *et al.*, 1994; COLWELL, 1996; RUBIN, 2000; CAVALLO e STABILI, 2002; TANTILLO *et al.*, 2004; URAKAWA e RIVERA, 2006; LHAFI e KUHNE, 2007).

Das 65 espécies do gênero *Vibrio* (THOMPSON e SWINGS, 2006), somente três espécies, *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*, são responsáveis pela maioria das infecções veiculadas por alimentos e foram selecionadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para avaliar o risco da presença destas três espécies nos produtos marinhos. A crescente globalização da produção e comercialização de alimentos faz surgir possibilidades de disseminação destas bactérias patogênicas para além das fronteiras dos países produtores, resultando em novas situações de risco à saúde do consumidor (RIVERA *et al.*, 2008).

Neste trabalho focamos a pesquisa de *V. cholerae* O1 toxigênico como bactéria patogênica, modelo que poderia ser encontrado nos três ecossistemas marinhos selecionados. Utilizando a metodologia tradicional de crescimento em caldo APA permitiu a obtenção de 50 isolados presuntivos (24 de Santos, 17 de São Sebastião e 9 de Ubatuba). Entretanto, quando confirmados pelas técnicas de PCR e ERIC-PCR os resultados foram negativos para a presença de *V. cholerae* nas amostras analisadas dos três ecossistemas estudados. A técnica de seqüenciamento realizada em 37 isolados presuntivos permitiu confirmar que dentre as alternativas de identificação dadas pelo BLAST e RDP não foi considerada a espécie de *V. cholerae*. Entretanto, os isolados presuntivos foram identificados como: *V. campbellii* (8),

V.natriegens (4), *V.proteolyticus* (4), *V.rotiferianus* (4), *V. olivaceus* (3), *V.vulnificus* (2), *V.parahaemolyticus* (1), *V.furnissii* (1), *V.alginolyticus* (1), *V.diabolicus* (1), *V.agarivorans* (1), *V.harveyi* (1), *V.splendidus* (1), *V.nigripulchritudo* (1), *Pseudoalteromonas sp.* (1) e *Vibrio sp.* (1), espécies autóctones do ambiente marinho.

Markman (2009) num estudo paralelo ao nosso, identificou 8 isolados pertencentes à espécie *V. cholerae* não patogênica (*ctxA*-/*tcpA*-), sendo 1 de amostra de bivalves e 1 de amostra de plâncton em Ubatuba; 1 de amostra de plâncton e 2 de amostras de água em São Sebastião, e 3 de amostras de água em Santos, mostrando que a metodologia de contagem em placa é mais sensível que a metodologia clássica de enriquecimento.

São diversas as circunstâncias que podem permitir a emergência de cepas patogênicas de *V.cholerae* O1 tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. Modificações ecológicas dos ambientes naturais, mudanças climáticas, aumento do número de populações suscetíveis (por exemplo, indivíduos imunocomprometidos) entre outros. 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. Uma das fontes de transporte de espécies biológicas é a água de lastro de navios que transportam águas de regiões costeiras entre os países que pode resultar na interação com as cepas bacterianas da região (RIVERA *et al.*, 2003).

Finalmente, uma boa caracterização dos perigos microbiológicos presentes nos três ecossistemas marinhos no estado de São Paulo permitirá gerar ferramentas para a gestão do risco em ambientes aquáticos costeiros.

6.2 Preservação de cepas de *V.cholerae* em glicerol

O processo de criopreservação é essencial para a manutenção de cepas bacterianas em longo prazo. Todavia, durante o congelamento os cristais de gelo intracelulares formados causam ruptura das membranas celulares e prejudicam a viabilidade celular ao descongelamento (MEZA e MONROY, 2002).

O banco de cepas de *V.cholerae* conservado em glicerol a -20 °C evidenciou que a melhor concentração para manter a viabilidade depois de um tempo prolongado (12 meses) foi a concentração de 20% (vol/vol).

Dados similares foram encontrados por Gill e Roque (2006) que recomendam uma concentração de glicerol 15% (vol/vol) para a preservação de cepas de *Vibrio* em

temperaturas de -70 a -80 °C. A recuperação que os autores propõem é em caldo marinho ou em caldo tripticase de soja (TSB).

6.3 Indução de profagos de *V.cholerae*

V.cholerae é um exemplo de bactéria patogênica cujos fatores associados à virulência dependem em grande parte da infecção por fagos. Um importante fator de virulência desta bactéria é a toxina colérica, codificada por um fago temperado e filamentosos. As bactérias não patogênicas podem ser convertidas a patogênicas por transdução (WALDOR e MEKALANOS, 1996).

O impacto dos fagos na patogênese bacteriana pode ser dividido em dois grandes temas, a transdução e a predação. Os fagos podem mover genes, incluindo genes que codificam os fatores associados à virulência bacteriana (VFs), esse movimento pode ocorrer através transdução generalizada ou especializada (BREITBART *et al.*, 2005). Um entendimento do impacto dos fagos na patogênese bacteriana exige não somente um conhecimento dos fatores associados à virulência, mas também do processo de transdução e propagação no ambiente (DAVIS e WALDOR, 2005).

Neste estudo, os experimentos realizados para a indução dos profagos em *V.cholerae* O1 não evidenciaram a presença de placas de lises nos meios de cultura nem a presença de estruturas fágicas pela microscopia eletrônica. Talvez, a dose de radiação e os intervalos de tempo testados para a indução com luz ultravioleta (10 seg a 15 min) não foram eficientes, como também as concentrações de mitomicina C (0,5 a 100 µg/mL) usadas não foram apropriadas. Isto pode estar relacionado à aparente importância do crescimento residual para o desenvolvimento ou recuperação dos profagos depois da radiação com luz ultravioleta (QUIÑONES *et al.*, 2005, 2006). A noção que o repressor pode ser diluído para o crescimento residual como uma pré-condição para o desenvolvimento do fago poderia explicar os resultados encontrados neste estudo. Se as bactérias são irradiadas e chegam ao estágio de “starvation”, nem o crescimento, nem a lise acontecem se substâncias apropriadas no meio de cultura não são adicionadas depois de 3 a 4 horas. Se as condições favoráveis são oferecidas, então, o crescimento residual acontece e a lise pode ser observada (LWOFF, 1953). Talvez, se em nosso estudo as doses de indução fossem mudadas (maior tempo de exposição) e o meio fosse adicionado de outros sais se pudesse ter obtido placas de lise observáveis ao olho nu.

A exposição de *V. cholerae* O1 (ctx+) à luz ultravioleta e outros mutagênicos como mitomicina C, induzem a resposta do sistema SOS, incrementando a produção de virions

CTX. Porém, a indução do profago não resulta na excisão do cromossomo ou na morte celular. As interações moleculares que conduzem à indução profago CTX não são idênticas às interações que acontecem no fago λ , as interações são muito mais fortes (QUIÑONES *et al.*, 2005, 2006).

Algumas recentes pesquisas têm feito algumas colocações relacionadas aos genes que podem estar envolvidos no processo de indução. Aparentemente, a diminuição dos níveis do gene *LexA* que resulta da resposta SOS em *V. cholerae* alivia a repressão de *PrstA*, permitindo uma maior transcrição deste promotor e elevada produção de virions CTX (QUIÑONES *et al.*, 2005, 2006). Provavelmente, no nosso caso, a dose de indução não foi suficiente para permitir a transcrição do promotor para a produção de vibriófagos líticos.

6.4 Abundância de colifagos somáticos na região costeira de São Paulo

A abundância total de vírus em água do mar, normalmente é na faixa de 10^4 - 10^7 mL⁻¹ (PAUL e KELLOGG, 2000; WOMMACK e COLWELL, 2000; WILHELM e POORVIN, 2001; WEINBAUER, 2004). Muitos destes dados pode ser subestimados, devido à amostragem inadequada, preservação e longos períodos de armazenamento (WEN *et al.*, 2004) e os valores corretos serão, provavelmente na faixa de 10^6 - 10^8 mL⁻¹ (SUTTLE, 2005). Mesmo levando em consideração essas perdas, observações de variação em relação à abundância dos vírus no tempo e no espaço mostraram que a proporção pode variar densamente dependendo da profundidade como também da distância da costa (THINGSTAD *et al.*, 2008).

Os dados obtidos nesta pesquisa mostraram claramente que as concentrações de colifagos foram menores quando os níveis de *E. coli* foram também relativamente baixos. É sabido que devido à especificidade dos fagos, estes são incapazes de se replicar no ambiente sem sua célula hospedeira, e esta pode ser receptora somente quando encontra condições ótimas de crescimento (SUNDRAM *et al.*, 2002).

Quanto à metodologia tradicional de contagem de colifagos foi observado que era necessário um período de 24 horas de incubação para a diferenciação das placas de lise, pois com 6 horas as placas não eram nítidas o suficiente para realizar contagem e descrição de sua morfologia (Figura 24).

Nesta pesquisa foi observada uma relação entre as contagens dos colifagos somáticos com os coliformes termotolerantes ($r=0,626$), *E.coli* ($r=0,462$) e enterococos intestinais ($r=0,247$) nos três locais estudados de acordo com o grau de contaminação fecal. Dados que

concordam com os resultados encontrados por outros autores que encontraram relação entre coliformes termotolerantes e colifagos (ARCAT) em águas naturais e águas de esgoto e concluíram que a contagem de colifagos permite a avaliação do grau de contaminação fecal ou grau de poluição antrópica (ISBISTER *et al.*, 1983).

Estudos semelhantes na literatura relatam que em águas marinhas, *E.coli* e os colifagos são ligeiramente correlacionados (CONTRERAS-COLL *et al.*, 2002) e essa relação começa a diminuir quando a concentração de *E. coli* é diminuída (MANDILARA *et al.*, 2006).

Dutka *et al.* (1987) analisaram três tipos de água (rio, lago e mar) e correlacionaram positivamente os coliformes com colifagos, chegando a propor um padrão de qualidade em águas recreacionais de 20 UFP/100 mL. Loh *et al.* (1988) concluíram que os colifagos somáticos seriam indicadores alternativos adequados para a avaliação da poluição fecal de águas naturais, chegando a modificar o teste ARCAT para poder ser aplicado em campo.

No Brasil, Martins *et al.* (1989) avaliaram vários parâmetros microbiológicos (Coliformes (C), Coliformes termotolerantes (CT), teste P-A e colifagos-ARCAT) para a caracterização das águas brasileiras e os resultados obtidos indicaram que existia uma correlação positiva significativa entre os testes para detecção de C e CT, enquanto que as correlações do teste de colifagos com este teste não foram tão evidentes, mas foram constantes.

Normalmente a concentração de colifagos somáticos em águas de esgoto doméstico varia entre 10^5 e 10^6 UFP/100 mL (DHILLON *et al.*, 1976; IGNAZITTO *et al.*, 1980; FURUSE *et al.*, 1981; HAVELAAR *et al.*, 1986). O estudo da diversidade dos colifagos somáticos isolados em ambientes com baixa, mínima ou alta atividade antrópica dará subsídios para um maior esclarecimento na avaliação da qualidade microbiológica dos corpos de água e para a avaliação dos riscos para o consumo humano, para a balneabilidade ou para cultivo de produtos marinhos. Sabe-se que em águas naturais os colifagos são detectados em números elevados como resultado da poluição introduzida (IAWPRC STUDY GROUP, 1991). No Brasil, a norma CONAMA 357 (17/03/2005) dispõe diretrizes ambientais para o enquadramento dos ecossistemas aquáticos, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e a Resolução CONAMA no 274 (2000) estabelece normas para classes de água para consumo humano, recreação de contato primário, proteção das comunidades aquáticas e águas destinadas para a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas.

O uso de águas recreacionais contaminadas tem sido associado às doenças gastrointestinais e respiratórias em diversos estudos epidemiológicos (DUFOUR, 1984;

SEYFRIED *et al.*, 1985; CABELLI, 1989; FEWTRELL e BARTRAM, 2001; WADE *et al.*, 2003).

Cada vez mais, nossos ecossistemas marinhos estão sendo contaminados por microrganismos patogênicos vindos do esgoto cru ou parcialmente tratado, das inundações, da agricultura, dos abatedouros, das fezes de animais silvestres ou de humanos ou através de água de lastro dos navios (RIVERA e MARTINS, 1996; RUIZ *et al.*, 2000; URAKAWA; RIVERA, 2006) os quais atingem as águas das praias e expõem os banhistas ao contato com bactérias, fungos, vírus e protozoários e podem levar ao desenvolvimento de doenças ou infecções após o banho em águas contaminadas (RIVERA e MARTINS, 1996; CETESB, 2004). Assim também pode atingir áreas de criação de alimentos marinhos e áreas de preservação ambiental e sendo assim, é necessária a elaboração, difusão e execução de programas de vigilância ambiental e dentre eles o controle sanitário da qualidade da água.

Alguns autores têm sugerido a pesquisa de bacteriófagos tais como bacteriófagos F-específicos de RNA, fagos de *Bacteriodes fragilis*, além dos colifagos somáticos, como bons indicadores para monitorar a qualidade virológica da água. Os fagos apresentam tamanhos e morfologias semelhantes às de grupos de vírus entéricos patogênicos, além de possuírem características de sobrevivência e de transporte similares. Entretanto, as investigações realizadas com bacteriófagos têm mostrado baixa ocorrência ou ausência desses organismos em águas analisadas (BOSCH, 1998; GRIFIN *et al.*, 1999; GOFTI-LAROCHE *et al.*, 2001; BORCHARDT *et al.*, 2003; HOT *et al.*, 2003). Outro problema na contagem de colifagos é que os fagos com cauda podem apresentar placas de lise muito pequenas, grandes ou uma placa de difusão dramática no meio de cultura, que cientificamente, pode ser um problema difícil de ser resolvido. Um ponto relacionado é proveniente do fago G de *Bacillus*, o maior genoma conhecido de um tamanho de 500 Kpb (resultado não publicado). O fago G é tão grande que não é bem difundido através do ágar, de modo que suas placas de lise são pequenas demais para serem vistas, a não ser usando concentrações de ágar excepcionalmente baixas em ensaios de placas (SERWER *et al.*, 2007).

Existe uma ampla variedade de trabalhos estudando a distribuição dos fagos no ambiente, mas usam a microscopia eletrônica em forma direta, ou por sondas desenhadas para genes específicos de vírus (BERG *et al.*, 1989; PROCTOR e FUHRMAN, 1990; DEMUTH *et al.*, 1993; JIANG e PAUL, 1995; KELLOGG *et al.*, 1995). No entanto, estas abordagens não fornecem informações sobre a infectividade dos bacteriófagos e das suas células hospedeiras. Estas são questões fundamentais quando fagos são usados como indicadores, como é o caso de colifagos somáticos. Para obter informações mais precisas, é necessário obter placas de lise

em uma determinada bactéria, seguido da purificação e caracterização dos fagos. Praticamente, não existe qualquer informação sobre o número de partículas de linhagens específicas de fagos em água do mar, e no que diz respeito aos sedimentos marinhos. Essas informações podem ser obtidas apenas por plaqueamento diretamente da amostra, ou, menos precisa, pelo método de número mais provável. Vários autores têm tentado sem sucesso o isolamento de fagos por métodos diretos, e outros, embora por vezes com êxito, não publicaram suas conclusões (ACKERMANN, 1997).

Neste trabalho foi observada uma grande variedade de placas de lise durante o isolamento de colifagos dos diferentes tipos de amostras, água do mar, plâncton e bivalves. Não foi observada relação entre as características morfológicas das placas de lise e a família do fago isolado, fato que também foi constatado por Ackermann e Nguyen (1983) e Pedroso e Martins (1995).

Em Santos, obteve-se a maior diversidade de fagos, tanto em amostras de água do mar como de plâncton. Nesta região há evidência de que existe uma grande quantidade de matéria orgânica na água do mar, mistura complexa de compostos orgânicos com diferente composição química e estruturas físicas. A complexidade da composição e a estrutura da matéria orgânica, juntamente com a variável de abastecimento de regimes, é provavelmente um dos principais fatores que ajudam a manter uma elevada diversidade de comunidades nos oceanos. A matéria orgânica e as interações microbianas também exercem uma grande influência sobre as propriedades dos ecossistemas, incluindo a produção primária, cadeia alimentar e o fluxo dos ciclos biogeoquímicos (NAGATA, 2008).

Ackermann e Nguyen (1983) afirmaram que a identificação de bacteriófagos por microscopia eletrônica é simples e rápida e que a identificação pelo tamanho da placa de lise é taxonomicamente inaceitável. Assim, sugerem a microscopia eletrônica para os fagos de enterobactérias que são morfologicamente distintos, como um bom método de escolha para sua identificação. A resolução das micrografias eletrônicas obtidas neste trabalho foi eficiente para revelar detalhes da estrutura das partículas virais, como as espículas e fibras da cauda de colifagos da família *Myoviridae*. Haschemeyer e Myers (1972) afirmaram que, para a visualização de detalhes das partículas, o método de coloração negativa seria o mais utilizado e o mais simples, fornecendo bons resultados.

Nossas observações podem ser comparadas com outras pesquisas realizadas em amostras de água naturais: Demuth *et al.* (1993) estudaram, por microscopia eletrônica, a diversidade da população de bacteriófagos isolados de águas naturais (lagos). Os fagos não foram enriquecidos com cepas hospedeiras específicas. Os autores observaram que, de 125

fagos isolados, 50,4% eram *Siphoviridae*, 17,6% *Myoviridae*, 19,2% *Podoviridae* e 12,8% de classificação incerta. Esse estudo, embora com enfoque diferente do nosso, apresentou resultados semelhantes em termos de tipos e frequências das famílias detectadas.

Pedroso e Martins (1995), estudando colifagos isolados de ambientes aquáticos de água doce do Estado de São Paulo, detectaram colifagos pertencentes às famílias *Myoviridae* (47,7%), *Podoviridae* (36,4%) e *Siphoviridae* (15,4%), no entanto diferem nas frequências de detecção de cada família. Esses autores também não observaram fagos de família *Microviridae* em ambientes com atividade antrópica mínima.

Do Val em 1997 analisou 49 colifagos por microscopia eletrônica. Esta pesquisa revelou a presença das famílias *Myoviridae* (A1 e A2), *Siphoviridae* (B1 e B2) e *Podoviridae* (C1) nos isolados provenientes de amostras de águas (rios, lagos e nascentes) e as famílias *Myoviridae* (A1 e A2) e *Siphoviridae* (B1) em colifagos obtidos de amostras fecais.

Neste estudo foram isolados e caracterizados 54,5% de fagos com cauda e uma porcentagem de 45,5% sem cauda. Isto está de acordo com Ackermann (1996) que, em uma revisão sobre a frequência morfológica de bacteriófagos, afirmou que 96% dos vírus bacterianos descritos na literatura possuem cauda e que apenas 4% são cúbicos, filamentosos ou pleomórficos. O autor afirma que os fagos com cauda estão desigualmente distribuídos entre as famílias *Myoviridae* (24,5%), *Siphoviridae* (61,7%) e *Podoviridae* (13,9%) e que apenas 15% dos fagos com cauda possuem cabeça alongada.

Ackermann e Nguyen (1983), em um estudo sobre a distribuição de colifagos em águas de esgoto, usando a microscopia eletrônica, encontraram fagos pertencentes às famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Microviridae* e não detectaram fagos RNA cúbicos nem filamentosos. Também em nosso trabalho não foram detectados este tipo de fagos. Deve-se destacar, no entanto, que esses autores inocularam amostras de água de esgoto com trinta e cinco cepas de *E.coli*, o que poderia ter favorecido a detecção de uma diversidade maior de fagos. Já em nosso estudo os fagos foram purificados através de isolamento da placa de lise utilizando somente uma cepa hospedeira, a *E.coli* ATCC 13076.

As dimensões dos fagos encontradas neste estudo correspondem a aquelas para fagos de enterobactérias reportadas na literatura (ACKERMANN, 1976; ACKERMANN; NGUYEN, 1983). Na nossa pesquisa foram observados quatro morfotipos diferentes: AI (3%), BI (63%), C1 (21%) e D1 (13%), como descritos por Ackermann e Eisenstark (1974) serem frequentes em enterobactérias.

6.5 Caracterização molecular de colifagos somáticos

6.5.1 Caracterização por rep-PCR

As técnicas de rep-PCR (BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR) são consideradas importantes ferramentas para estabelecer a relação genética entre microrganismos e realizar a tipagem de uma ampla variedade de bactérias Gram-negativas e vários gêneros de bactérias Gram positivas devido ao seu alto poder discriminatório e baixo custo (LOUWS *et al.*, 1996; CIAPINA, 1997; RADEMAKER e DE BRUIJN, 1997; VERSALOVIC *et al.*, 1998). Por esse motivo, no presente trabalho, foram testadas as técnicas de rep-PCR com o objetivo de comprovar a sua eficiência na caracterização molecular dos colifagos.

Um total de 62 colifagos foi submetido às técnicas de rep-PCR com o intuito de verificar a similaridade entre esses isolados. Os perfis genéticos obtidos foram analisados pelo programa *Bionumerics* (Applied Maths), versão 5.00. A matriz de similaridade genética entre os isolados foi construída utilizando o Coeficiente de Dice e os agrupamentos foram realizados utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*). Foi utilizado o valor de 1% de posição de tolerância de bandas (*band position tolerance*) para comparação dos fragmentos. A reprodutibilidade das técnicas de ERIC-PCR e BOX-PCR foi confirmada realizando uma repetição de ambas as técnicas em todos os colifagos isolados e em todas as reações de PCR realizadas foram utilizados quatro cepas de *Vibrio cholerae* (RC11, RC230, RC231, 569B), *E.coli* (LT0761 e ST4142-2) como controles positivos das metodologias. O teste de reprodutibilidade foi de 97% para todos os colifagos.

Comparando os resultados obtidos pelo ERIC e BOX-PCR em relação à sensibilidade do método foi verificado que o BOX-PCR apresentou uma melhor diferenciação, mas, nenhuma das metodologias foi o suficientemente discriminatória para agrupar os colifagos segundo sua caracterização taxonômica, tipo de amostra e origem do isolado.

Um trabalho realizado por Fattouh e colaboradores no ano 2002, confirmou que uma alternativa de técnica discriminatória para a caracterização dos colifagos poderia ser a RAPD-PCR, pois esta conseguiu diferenciar os vários tipos morfológicos obtidos até mesmo numa mesma família. Eles concordaram também que técnicas como rep-PCR não oferecem um poder discriminatório necessário na caracterização molecular.

6.5.2 Caracterização por RFLP

Numa pesquisa feita por Do Val no ano de 1997, 100 colifagos foram submetidos à análise de polimorfismo pela clivagem dos DNAs com as enzimas *EcoRI* e *EcoRV*. A enzima *EcoRI* foi mais eficiente na clivagem e produziu um maior número de fragmentos. Entre os colifagos isolados de águas pouco poluídas a digestão foi mais eficiente a 35 °C (80%), quando comparada com os isolados a 20 °C (45%). A digestão dos DNAs de colifagos provenientes de águas com elevado grau de poluição e de fezes humanas e animais foi menor quando utilizadas as duas enzimas de restrição.

Neste estudo foi observada que a enzima *EcoRI* apresentou melhor frequência de digestão, para todas as amostras testadas, tendo clivado até 100% dos colifagos isolados de águas pouco poluídas, entretanto observou-se menor eficiência de clivagem em colifagos isolados de ambientes mais poluídos. Os resultados parciais do RFLP foram analisados utilizando o programa *Bionumerics* e coeficiente de Dice e pode-se observar que a maioria dos colifagos somáticos isolados na região poluída de Santos mostrou somente um fragmento indicando talvez a não digestão do DNA.

A frequência de digestão da enzima *HinfI* foi bem menor, quando comparada com *EcoRI*. A enzima *DraI* diferenciou melhor os colifagos, pois a amplificação das bandas foi com maior frequência e maior definição.

A análise dos perfis de restrição, obtidos após a digestão com as enzimas *EcoRI* e *HinfI*, mostrou que os colifagos pertencentes a uma mesma família apresentaram diferentes números de fragmentos. Os colifagos pertencentes à família *Myoviridae*, cujos DNAs foram digeridos com a enzima *EcoRI*, apresentaram um fragmento comum, de tamanho de 11,909Kb.

Esses dados estão de acordo com os obtidos por Wilson *et al.* (1993) que, em estudos de caracterização molecular de cianofagos, obteve maior frequência de digestão (80%) utilizando *EcoRI* e com os dados de Loessner *et al.* (1993) que obtiveram melhores resultados de digestão com *EcoRI* (44,4%) e *EcoRV* (88,9%) em caracterização a nível molecular de fagos de *Enterobacter*.

Já se comparando as populações de fagos isoladas nesta pesquisa (ambientes aquáticos pouco poluídos, moderadamente poluídos e com atividade antrópica eminente) foram verificados comportamentos diferentes quanto à frequência de digestão pelas enzimas utilizadas e também quanto ao número de fragmentos produzidos. Os colifagos isolados de amostras de água com maior grau de poluição não tiveram seus DNAs digeridos ou a

frequência de digestão foi muito baixa. Esse comportamento pode estar relacionado com a composição química das águas de esgoto que podem interferir na atividade enzimática frente ao DNA do colifago.

Os polimorfismos gerados pela análise com as enzimas de restrição não permitiram diferenciar os colifagos das diferentes populações, mostrando haver uma grande diversidade de colifagos nas amostras estudadas principalmente pelo grau de poluição.

6.6 Caracterização e seqüenciamento dos colifagos ST e LT positivos

O fato de termos encontrado colifagos contendo os genes que codificam para as toxinas ST e LT é sinal de um risco de surgimento e evolução de novas linhagens patogênicas em bactérias. Acredita-se, atualmente, que o surgimento dos vários tipos patogênicos de *E. coli* seja um processo evolutivo a partir de cepas comensais. Embora *E. coli* seja encontrada no ambiente e ocorra no intestino animal, a transferência de genes entre as cepas tem permitido a transição de tipos comensais para patogênicos (FINLAY e FALKOW, 1997).

Provavelmente o aspecto mais incerto dos vírus marinhos é seu papel na transferência genética e na adaptação ao meio ambiente. Embora segundo o conceito tradicional, a transdução opera geralmente dentro de uma escala restrita ao hospedeiro. Um estudo realizado por Chiura (1997) indica que alguns vírus bacterianos marinhos são capazes de uma não específica transferência horizontal de genes. Outra consideração é que resíduos bacterianos de DNA podem ser encontrados prontamente na água de mar, como produto da lise viral, e podem ser adquiridos por outros organismos através do processo de transformação (FUHRMAN, 1999).

Os processos da transferência horizontal e a transformação teriam o efeito de misturar genes entre uma variedade ampla de espécies, com efeitos na adaptação e na evolução. Embora transferências deste tipo possam ser extremamente raras, a abundância bacteriana típica de 10^9 por litro dentro da zona eutrófica e o volume enorme do mar ($3,6 \times 10^7$ km³ em uma superfície de 100 m), acoplado com tempos de geração, na ordem de um dia, implicam que um evento, com uma probabilidade somente de 10–20 por geração estaria ocorrendo aproximadamente um milhão de vezes ao dia. Assim, este processo pode ter efeitos principais na estrutura genética e na evolução da população global das bactérias marinhas. Deve igualmente ser considerada na avaliação, a propagação potencial de genes de resistência aos antimicrobianos, introduzida pelo cultivo intensivo de frutos do mar (BREITBART *et al.*, 2008).

Os principais fatores associados à virulência em *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) para produzir diarreias são as enterotoxinas e as adesinas fimbriais. A ETEC, que contém plasmídeos que codificam genes para as toxinas termo-lábil (LT) e termo-estável (ST) é causadora de diarreia em regiões onde as condições de saneamento básico são precárias, sendo alta a sua incidência em crianças.

A detecção dessas toxinas em ambientes aquáticos é importante no que se refere à ocorrência de surtos. A utilização de bioensaios clássicos permite identificar microrganismos fenotipicamente patogênicos, porém, somente a análise do DNA revela o potencial genético para virulência (MARTINS *et al.*, 1992).

Atualmente o conceito de patogenicidade em cepas de *E. coli* está relacionado ao impacto acumulativo de um ou vários fatores associados à virulência, o qual serve para diferenciar cepas patogênicas de não patogênicas (JOHNSON, 1991; CLARKE, 2001). As características de virulência podem ser transferíveis através de fagos de amostras patogênicas para não patogênicas. É comprovado que os genes que codificam as Stx1 e Stx2 estão relacionados a bacteriófagos (SMITH *et al.*, 1983).

Num estudo feito em águas residuárias da área urbana de Barcelona foi determinado o número de fagos infecciosos para *E.coli* 157:H7 entre 1-10. Adicionalmente, foi detectada a presença dos fagos portadores do gene *stx2* em águas de diferentes origens geográficas, demonstrando que não é um fato isolado. Os estudos de persistência realizados evidenciaram que esses fagos persistem mais que *E.coli* 0157:H7 frente aos processos de inativação natural como também aos tratamentos de cloração e pasteurização. A pesquisa da inativação diferencial de diferentes morfologias permitiu concluir que os fagos da família *Siphoviridae* sobrevivem mais aos processos de inativação. Os fagos que apresentaram o gene *stx2* pertenciam à família *Siphoviridae*. A elevada presença e persistência desta classe de fagos os colocam como reservatórios importantes do gene *stx2* no ambiente (MUNIESA, 1999).

Segundo os dados do seqüenciamento dos genes que codificam para as toxinas LT e ST foi evidenciado que os colifagos partilham uma longa história evolutiva com seus hospedeiros, pois observou-se uma grande homologia genética entre as seqüências de genes encontrados em *E.coli* e *V.cholerae*. Alguns estudos sugerem que as famílias de DNA *Podoviridae*, *Siphoviridae* e *Myoviridae* podem infectar tanto enterobactérias como cianobactérias e outras bactérias Gram negativas (HAMBLY e SUTTLE, 2005). Mas até onde se sabe estas famílias não infectam *Archaea*, com isto, alguns pesquisadores especulam que a existência dos fagos antecedeu a divisão das cianobactérias provenientes do resto das bactérias Gram negativas, 3 a 3, 5 mil milhões de anos atrás. Isto também sugere que o seu

surgimento foi posterior à divergência de *Archaea*. A origem dos procariotos, provavelmente antecede aos eucariotos em cerca de um bilhão de anos e que as interações fago-hospedeiro foram as interações biológicas dominantes durante o início da vida na Terra. Os fagos podem ser os principais agentes de mortalidade, os vetores da transmissão de genes e os controladores de nutrientes e energia dos ecossistemas (ABEDON, 2008).

O intuito desta pesquisa foi focar um pouco a atenção em duas áreas de grande interesse que estão estreitamente ligadas e que estão prestes a serem ativamente exploradas: a diversidade dos fagos e a transferência de genes no ambiente marinho. Os novos métodos moleculares que permitem estudar a diversidade dos vírus e dos seus hospedeiros nos seus habitats naturais facilitarão um melhor entendimento das interações entre as comunidades do ecossistema marinho e de sua evolução.

A transferência horizontal de genes, sem dúvida, ocorre em comunidades microbianas naturais. No entanto, a escala do processo, os benefícios para os hospedeiros, os vírus e as implicações para a evolução dos organismos envolvidos são mal compreendidas (HAMBLY e SUTTLE, 2005).

A presença de colifagos em águas, mesmo em baixas concentrações representa um perigo à população. Após a replicação, estes são excretados e dispersos pela ação das águas no ambiente, e a sua ação infectante fica facilitada pela elevada estabilidade e resistência que apresentam aos processos de tratamento. Devido a isto o monitoramento dos colifagos é necessário em ambientes marinhos.

O presente estudo está identificando os colifagos como “perigos microbiológicos” no ambiente costeiro que podem afetar a saúde humana e animal, e dando subsídios para estudos posteriores na avaliação do risco microbiológico do ecossistema marinho.

7 CONCLUSÕES

O ambiente marinho de Santos apresentou uma maior frequência dos indicadores de contaminação fecal (CF e EF) e, conseqüentemente, de colifagos. Isto poderia estar associado à evidente atividade antropogênica com grande concentração de matéria orgânica proveniente de dejetos domésticos e industriais em comparação com os ambientes de São Sebastião e Ubatuba, regiões com atividade antrópica moderada ou mínima.

As concentrações de colifagos somáticos em plâncton foram maiores em comparação com as amostra de água do mar e bivalves, sugerindo algum tipo de associação com este tipo de organismo.

Não foi encontrada relação entre as características macroscópicas das placas de lise e as famílias detectadas através de microscopia eletrônica.

Em ambientes aquáticos provenientes de áreas com atividade antrópica mínima (Ubatuba), a família *Siphoviridae* foi a mais freqüente (75%), seguida por *Podoviridae* (25%) e não foram encontrados fagos das famílias *Microviridae* e *Myoviridae*.

Em áreas com moderado impacto humano (São Sebastião), as famílias *Siphoviridae* (53,84%), *Microviridae* (30,8%) e *Podoviridae* (15,4%) foram as predominantes. Não se encontraram fagos pertencentes à família *Myoviridae*.

Em Santos, área com atividade antrópica evidente, as principais famílias foram: *Siphoviridae* (62,22%), *Podoviridae* (24,44%), *Microviridae* (8,88%) e *Myoviridae* (4,44%).

Foram observados quatro morfotipos diferentes nos colifagos isolados dos três ecossistemas: A1 (3%), B1 (63%), C1 (21%) e D1 (13%).

As enzima *EcoRI* e *DraI* apresentaram melhor freqüência de digestão para todas as amostras testadas, tendo clivado até 100% dos colifagos isolados de águas pouco poluídas.

Os polimorfismos gerados pela análise com as enzimas de restrição não permitiram

diferenciar os colifagos das diferentes populações, mostrando haver uma grande diversidade nas amostras estudadas, principalmente, pelo grau de poluição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABEDON, S. **Bacteriophage ecology. Population growth, evolution, and impact of bacterial viruses.** Cambridge: Cambridge University Press, 2008. p.508.

ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; BAUER, R. F. R; SOUSA, E. C. P. M.; HORTELANI, M. A.; SARKIS, J. E. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Mar. Poll. Bull.**, v. 50, p. 875-885, 2005.

ACKERMANN, H. W.; EISENSTARK, A. The present stage of phage taxonomy. **Intervirol.**, v. 3, p. 201-219, 1974.

ACKERMANN, H.W. La classification des phages caudés des entérobactéries. **Pathol. Biol.**, v. 24, p. 359-370, 1976.

ACKERMANN, H. W.; NGUYEN, T. M. Sewage coliphages studied by electron microscopy. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, p. 1049–1059, 1983.

ACKERMANN, H.; DUBOW, M. **Viruses of prokaryotes.** General properties of bacteriophages. Boca Raton, FL: CRC Press, 1987. v.1, 202 p.

ACKERMANN, H. W. Frequency of morphological phage descriptions. **Arch. Virol.**, v.124, n. 3-4, p.201-209, 1992.

ACKERMANN, H. W.; GERSHMAN. Morphology of phages of a general *Salmonella* typing set. **Res.Virol.**, v.143, p. 303-310, 1992.

ACKERMANN, H. W.; AZIZBEKYAN, R. R.; EMADI KONJIN, H. P.; LECADET, M. M.; SELDIN, L.; YU, M.X. New *Bacillus* bacteriophage species. **Arch. Virol.**, v.135, p. 333-344, 1994a.

ACKERMANN, H. W.; BROCHU, G.; EMADI KONJIN, H. P. Classification of *Acinetobacter* phages. **Arch. Virol.**, v. 135, p. 345-354, 1994b.

ACKERMANN, H. W. Frequency of morphological phage descriptions in 1995. **Arch. Virol.**, v. 141, p. 209-218, 1996.

ACKERMANN, H. W. Bacteriophage ecology. In: MARTINS, M. T.; SATO. M. I. Z.; TIEDJE, J. M.; HAGLER, L. C. N.; OBEREINER, J. D.; SANCHEZ P. S. (Ed.). **Progress in Microbial Ecology** (Proceedings of the Seventh International Symposium on Microbial Ecology). São Paulo: Brazilian Society for Microbiology/International Committee on Microbial Ecology, 1997. p. 335–339.

ACKERMANN, H. W.; BERTHIAUME, L.; TREMBLAY, M. **Virus Life in Diagrams.** Boca Rato, FL: CRC Press LLC, 1998.

* De acordo com:

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

ACKERMANN H. W. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. **Adv. Virus Res.**, v. 51, p.135-201, 1999.

ACKERMANN, H. W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000: brief review. **Arch. Virol.**, v. 146, 843–57, 2001.

ACKERMANN, H. W. Classification of bacteriophages. In: CALENDAR, R. L.; ABEDON, S.T. (Ed.). **The Bacteriophages**. 2nd edn. Oxford: Oxford University Press, 2006. p. 8–16.

ALMEIDA, B.C. **Diversidade de bactérias isoladas de água do mar no Canal de São Sebastião, Litoral Norte do estado de São Paulo**. 36 f. Qualificação (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Relatório Técnico. Diagnóstico microbiológico de áreas de risco nos portos de Santos, Paranaguá, Recife, Belém, Fortaleza, Rio Grande e Sepetiba**. Brasília: ANVISA, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed. New York: APHA, 1995. 953 p.

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

ARANDA, K.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.12, p. 5849-5853, 2004.

ARAUJO, R. M.; PUIG, A.; LASOBRAS, J.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Phages of enteric bacteria in fresh water different levels of fecal pollution. **J. Appl. Microbiol.**, v. 82, p. 281-286, 1997.

ARGENTINO-SANTOS, R.C. **Avaliação ecotoxicológica do sedimento do local de disposição do material dragado do Porto de Santos e da área de influência direta**. 124 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BARKSDALE, L. E.; ARDEN, S. B. Persisting bacteriophage infections, lysogeny, and phage conversions. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 25, p. 265-299, 1974.

BERGH, O.; BORSHEIM, K.Y.; BRATBAK, G.; M. HELDAL. High abundance of viruses found in aquatic environments. **Nature**, v. 340, p. 467-468, 1989.

BITTON, G. Fate of bacteriophages in water and wastewater treatment plants. In: GOYAL, S.M.; GERBA, G.P.; BITTON, G. (Ed.). **Phage ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 181-195.

- BORCHARDT, M. A.; BERTZ, P. D.; SPENCER, S. K.; BATTIGELLI, D. A. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 1172-1180, 2003.
- BORRERO, J. J.; MORIÑIGO, M. A.; VICENTE, A.; CORNAX, R.; ROMERO, P. Coliphage as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms. **Water Res.**, v. 21, p. 1473-1480, 1987.
- BORRERO, J. J.; CORNAX, R.; MORIÑIGO, M. A.; MARTINEZ-MANZANARES, E.; ROMERO, P. Coliphage as indicator of faecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. **Water Res.**, v. 24, p. 111-116, 1990.
- BOSCH, A. Human enteric viruses in water environment: a minireview. **Intl. Microbiol.**, v. 1, p. 191-196, 1998.
- BOYD, E.; WALDOR, M. Alternative mechanism of cholera toxin acquisition by *Vibrio cholerae*: generalized transduction of CTXPhi by bacteriophage CP-T1. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5898-5905, 1999.
- BRAGA, E. S.; MULLER, T. J. Observation of regeneration of nitrate, phosphate and silicate during upwelling off Ubatuba, Brazil, 23°S. **Continent. Shelf Res.**, v. 18, p. 915-922, 1998.
- BRAGA, E. S.; NIENCHESKI, L. F. H. **Composição das massas de água e seus potenciais produtivos na área entre o Cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS)**. In: ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C.; MADUREIRA, L.S.P. (Ed.). O ambiente oceanográfico da plataforma continental e do talude na região Sudeste-Sul do Brasil. São Paulo: EDUSP, 2006. p. 161-218.
- BREITBART, M.; FELTS, B.; MAHAFFY, J.; NULTON, M.; SALAMON, P.; ROHWER, F. Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community. **Proc. R. Soc. Lond., Ser. B.**, v. 27, p. 565-574, 2004.
- BREITBART, M.; ROHWER, F.; ABEDON, S. Phage ecology and bacterial pathogenesis. In: WALDOR, M. K.; FRIEDMAN, D. I.; ADHYA, S. L. (Ed.). **Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology**. Washington D.C: ASM Press, 2005. p. 66-91.
- BREITBART, M.; THOMPSON, L.; SUTTLE, C.; SULLIVAN, M. Exploring the vast diversity of marine viruses. **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 135-138, 2007.
- BREITBART, M.; MIDDELBOE, M.; ROHWER, F. Marine viruses: community dynamics, diversity and impact on microbial processes. In: KIRCHMAN, D. (Ed.). **Microbial Ecology of the oceans**. New York: Wiley-Liss, 2008. p. 443-480.
- BRENNER, S.; HORNE, R. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 34, p. 103-110, 1959.
- BRÜSSOW, H.; FRÉMONT, M.; BRUTTIN, A.; SIDOTI, J.; CONSTABLE, A.; FRYDER, V. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 4537-4543, 1994.

BRÜSSOW, H.; HENDRIX, R. W. Phage genomics: small is beautiful. **Cell**, v. 108, p. 13-16, 2002.

BRÜSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W. D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 560-602, 2004.

BRÜSSOW, H.; KUTTER, E. Genomics and the evolution of tailed phages. In: KUTTER, E; SULAKVELIDZE, A (Ed.). **Bacteriophages: Biology and Application**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005a. p. 91-128.

BRÜSSOW, H.; KUTTER, E. Phage ecology. In: KUTTER, E; SULAKVELIDZE, A (Ed.). **Bacteriophages: Biology and Application**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005b. p. 129-64.

BRÜSSOW, H.; DESIERE, F. Evolution of tailed phages: insights from comparative phage genomics. In: CALENDAR, R. L.; ABEDON, S. T. (Ed.). **The Bacteriophages**. 2nd edn. Oxford: Oxford University Press, pp. 26- 36, 2006.

BULL, A. T.; STACH, J. E. M. An overview of biodiversity: estimating the scale. In: BULL, A.T. (Ed.). **Microbial Diversity and Bioprospecting**. Washington, D.C.: ASM Press, 2004. p. 15-28.

CABELLI, V. J. Swimming-Associated Illness and Recreational Water Quality Criteria. **Water Sci. Technol.**, v. 21, n. 2, p 13-21, 1989.

CASJENS, S. R. Comparative genomics and evolution of the tailed- bacteriophages. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 451-8, 2005.

CASTILLO, G.; THIERS, R.; DUTKA, B.J.; EL-SHAARAWI, K. Coliphages association with coliform indicators: a case study in Chile. **Toxicity Assess.**, v. 3, p. 535-550, 1988.

CASTRO FILHO, B. M. Wind driven currents in the Chanel of São Sebastião: winter 1979. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 38, p. 111-132, 1990.

CASTRO FILHO, B. M.; LORENZZETTI, J. A.; SILVEIRA, I. C. A.; MIRANDA, L. B. Estrutura termohalina e circulação na região entre o cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS). In: ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C.; MADUREIRA, L.S.P. (Ed.). **O ambiente oceanográfico da plataforma continental e do talude na região Sudeste-Sul do Brasil**. São Paulo: EDUSP, 2006. p. 121-160.

CASTRO FILHO, B. M.; MIRANDA, L. B.; MIYAO, S. Y. Condições hidrográficas na Plataforma Continental ao largo de Ubatuba: variações sazonais e em média escala. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 35, n. 2, p. 135-151, 1987.

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.

CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION (CFSAN)/ FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Draft risk assessment on the public health impact of *Vibrio parahaemolyticus* in raw molluscan shellfish.** FDA, 2000. 102 p.

CHIANG, S. L.; MEKALANOS, J. Horizontal gene transfer in the emergence of virulent *Vibrio cholerae*. In: ROSENBERG, E. (Ed.). **Microbial ecology and infectious disease.** Washington, D. C.: ASM Press, 1998. p. 156-169.

CHIURA, H.X. Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria. **Aquat. Microb. Ecol.**, v. 13, p. 75–83, 1997.

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, n. 5, p. 2202–2208, 1999.

CIAPINA, L. P. **Diferenciação genômica de bactérias gram-negativas e gram-positivas pela análise do gene 16S rDNA e rep-PCR.** 113 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus Jaboticabal-UNESP, São Paulo, 1997.

CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* – an emerging problem? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 41, p. 93–98, 2001.

COCHRAN, P.; KELLOGG, C.; PAUL, J. Prophage induction of indigenous marine lysogenic bacteria by environmental pollutants. **Mar. Ecol. Progr. Ser.**, v.164, p.125-133, 1998.

COLWELL, R. R. Bacteria and viruses. Indicator of environmental changes occurring in estuaries. **Environ. Int.**, p. 223-231, 1978.

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

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

COLWELL, R. R.; HUQ, A. Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*. The causative agent of cholera. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 740, p. 44-54, 1994.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de balneabilidade das praias Paulistas.** São Paulo: CETESB, 2000. p. 95-99.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas litorâneas do estado de São Paulo 2004.** São Paulo: CETESB, 2005. (Series Relatórios).

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de águas litorâneas do Estado de São Paulo: balneabilidade das praias.** São Paulo: CETESB, 2004.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas litorâneas do estado de São Paulo 2004**. São Paulo: CETESB, 2005. (Series Relatórios).

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas litorâneas do estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2008. 294 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução Nº 274**, 29 de Novembro de 2000.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução Nº 357**, 17 de março de 2005.

CONTRERAS-COLL, N.; LUCENA, F.; MOOIJMAN, K. Occurrence and level of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. **Water Res.**, v. 36, p. 4963-4974, 2002.

CORNAX, R.; MORIÑIGO, M.; BALEBONA, C.; CASTRO D.; BORREGO, J. Significance of several bacteriophages groups as indicators of sewage pollution in marine waters. **Water Res.**, v. 56, n. 10, p. 3170-3173, 1991.

CORNAX, R.; MORIÑIGO, M. A.; GONZALEZ-JAEN, F.; ALONSO, M.C.; BORREGO, J.J. Bacteriophages presence in human faeces of healthy subjects and patients with gastrointestinal disturbances. **Zbl. Bakteriolog.**, v. 281, p. 214-224, 1994.

DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. Virulence-linked bacteriophages of pathogenic vibrios. In WALDOR, M. K.; FRIEDMAN, D. I.; ADHYA S. L. (Ed.). **Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology**. Washington DC: ASM Press, 2005. p. 187–205.

DEMUTH, J.; NEVE, H.; WITZEL, K. Direct electron microscopy study on the morphological diversity of bacteriophage populations in Lake Plußsee. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3378-3384, 1993.

DENHART, D.D. The single-stranded ADN bacteriophages. **CRC Crit. Rev. Microbiol.**, v. 4, p.161-224,1975.

DHILLON, T. ; DHILLON, E. ; CHAU, H., LI, W.; TSANG, A. Studies on bacteriophage distribution: virulent and temperate bacteriophage content of mammalian feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 32, p. 68-74, 1976.

DO VAL, R. **Estudo da biodiversidade de colifagos somáticos isolados de ambientes aquáticos e de fezes humanas e animais**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

DRAKE, J. A.; HUXEL, G. R.; HEWITT, C.L. Microcosms as models for generating and testing community theory. **Ecology**, v. 77, p. 670–7, 1996.

DUCKWORTH, D. H.; GLENN, J.; MCCORQUODALE, D. J. Inhibition of bacteriophage replication by extrachromosomal genetic elements. **Microbiol. Rev.**, v. 45, p.52-71, 1981.

DUFOUR, A. P.; Health effects criteria for fresh recreational waters. Cincinnati, OH, 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. 245-54, 1984.

DUTKA, B.; EL-SHARA AWI, A.; MARTINS, M.; SANCHEZ, P. North and South American studies on the potencial of coliphages as a water quality indicator. **Water Res.**, v. 21, p. 1127-1135, 1987.

EL-ABAGY, M.M.; DUTKA, B.J.; KAMEL, M. Incidence of coliphage in potable water supplies. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 1632-1633, 1988.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Improved enumeration Methods for the recreational water quality indicators: Enterococci and *Escherichia coli***. Washington, D.C.: EPA, 2000, v. 821/R-97/004. 49 p.

ESPELAND, E.; LIPP, E.; HUQ, A.; COLWELL, R. Polysogeny and prophage induction by secondary infection in *Vibrio cholerae*. Brief Report. **Environ. Microbiol.**, v. 6, n. 7, p.760-763, 2004.

FARRAH, S.R. Ecology of phage in freshwater environments. In: GOYAL, S.M.; GERBA, G.P.; BITTON, G. (Ed.). **Phage ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 125-136.

FARUQUE, S.; ASADULGHANI, A.; A.R.M.A.A.; ALBERT, M.; ISLAM, K.; MEKALANOS, J. Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 e O139. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3752-3757, 1998.

FATTOUH, F.; HESHAM, S.; SAHAR, M. WEFKI. PCR-based DNA Fingerprinting Analysis of Coliphages Isolated from Sewage Polluted Seawater in Alexandria. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 5, n. 9, p. 938-942, 2002.

FEWTRELL, L.; BARTRAM, J. **Water Quality: Guidelines, Standards and Health. Assessment of Risk and Risk Management for Water-Related Infectious Disease**. World Health Organization Water Series. London: IWA Publishing, 2001. p. 424.

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. 2118-21, 1992.

FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in pathogenicity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 30, p. 136-169, 1997.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION /WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Risk assessment of *V.vulnificus* in raw oysters**. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/008/a0252e/a0252e00.htm>>. Acesso em: 29 mar. 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION /WORLD HEALTH ORGANIZATION. **State of world aquaculture 2006**. Roma: FAO, 2006. 134 p. (FAO Fisheries Technical Paper, n. 500).

FOUTS. Phage_Finder: automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. 20, p. 5839–5851, 2006.

FRANK, H.; MOEBUS, K. Helgol. **Meeresunters**, v. 41, 385–414, 1987.

FROESE, R.; BISBY, F. A. **Species 2000 & IT IS Catalogue of Life: Indexing the World's Known Species**. Species 2000. Phillipines: Los Baños, 2002. CD-ROM.

FUKUMOTO, M. M. **Caracterização da sedimentação atual e reconstituição da história deposicional recente na Baía de Santos, a partir das características composicionais e isotópicas da matéria orgânica**. 109 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

FUHRMAN, J. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. **Nature**, v. 399, p. 541-546, 1999.

FUHRMAN, J. Impact of viruses on bacterial processes. In: KIRCHMAN, D.L. (Ed.). **Microbial Ecology of the oceans**. New York: Wiley-Liss, 2000. p. 327-350.

FUNDAÇÃO DE ESTUDOS E PESQUISAS AQUÁTICAS. **Diagnóstico ambiental oceânico e costeiro das regiões sul e sudeste do Brasil**. São Paulo: FUNDESPA, 1994.

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

FURTADO, V.V. Sedimentação quaternária no Canal de São Sebastião. **Publicação especial do Instituto Oceanográfico**, v. 11, p. 27-35, 1995.

FURUSE, K.; ANDO, A.; OSAWA, S.; WATANABE, I. Distribution of ribonucleic acid coliphages in raw sewage from treatment plants in Japan. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, p. 1139-1143, 1981.

FURUSE, K.; OSAWA, S.; KAWASHIRO, J.; TANAKA, R.; OZAWA, A.; SAWAMURA, S.; YANAGAWA, Y.; NAGAO, T.; WATANABE, I. Bacteriophage distribution in human faeces: continuous survey of healthy subjects and patients with internal and leukaemic diseases. **J. Gen. Virol.**, v. 64, p. 2039- 2043, 1983.

GAETA, S.A.; RIBEIRO, S.M.S.; METZLER, P.M.; FRANCO, M.S.; ABE, D.S. Environmental forcing on phytoplankton biomass and primary productivity of the coastal ecosystem in Ubatuba region, southern Brazil. **Rev. Bras. Ocean.**, v. 47, p. 11-27, 1999.

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.

GARRAFA, P.; BARRELLA, K.; MONEZI, T.; HÁRSI, C.; BRIGHETTI, J.; MEHNERT, D. Evaluation of virological, bacteriological and physico-chemical parameters of well-water at the rural area of São José do Rio Preto, SP. **Virus Rev. Res.** 8: Abstract n. EV 2, p.100, 2003.

GEO BRASIL 2002. **Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil**. Organizado por Thereza Christina Carvalho Santos e João Batista Drummond Câmara. Brasília: Edições IBAMA, 2002. 440 p.

GERBA, C. P. Phage as indicators of fecal pollution. In: GOYAL, S.M.; GERBA, G.P.; BITTON, G. (Ed.). **Phage ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 197-209.

GILL, B.; ROQUE, A. Isolation, enumeration, and preservation of the *Vibrionaceae*. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Ed.). **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C.: ASM Press, 2006. p. 29-43.

GOFTI-LAROCHE, L.; GRATACAP-CAVALLIER, B.; GENOULAZ, O.; JORET, J.; HARTEMAN, P.; SEIGNEURIN, J.; ZMIROU, D. A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). **Water Sci. Technol.**, v. 43, p. 39-48, 2001.

GOYAL, S.M. Methods in phage ecology. In: GOYAL, S. M; GERBA, G. P.; BITTON, G. (Ed.). **Phage Ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 197-209.

GOYAL, S. M.; GERBA, C. P.; BITTON, G. **Phage Ecology**. U. S. A.: Wiley-Interscience Publication, 1998.

GRABOW, W. O. K.; COUBROUGH, P.; NUPEN, E. M.; BATEMAN, B. W. Evaluation of coliphage as indicators of the virological quality os sewage-polluted water. **Water S.A.**, v.10, p. 7-14, 1984.

GRABOW, W. O. K.; NEUBRECH, T. E.; HOLTZHAUSEN, C. S.; JOFRE, J. *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages: excretion by humans and animals. **Water Sci. Technol.**, v. 31, p. 223-230, 1995.

GRIFIN, D.; GIBSON, C.; LIPP, E., RILEY, K.; PAUL, J.; ROSE, J. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 118-4125, 1999.

GRIMES, D. J. Ecology os estuarine bactéria capable of causing human disease: A review. **Estuaries**, v. 14, n. 4, p. 345-360, 1991.

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

HAMBLY, E.; SUTTLE, C. The viriosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 444-450, 2005.

HAMMOND, P.M. Described and estimated species numbers: an objective assessment of current knowledge. In: ALLSOPP, D.; COLWELL, R.R.; HAWKSWORTH, D.L. (Ed.).

Microbial Diversity and Ecosystem Function. United Kingdom: CAB International, Wallingford, 1995. p. 29-71.

HARARI, J.; CAMARGO, R.; CACCIARI, P.L. **Implantação de um sistema de previsão de marés e de correntes de maré na Baixada Santista através do modelo numérico tridimensional.** São Paulo: Instituto Oceanográfico, 1999. v. 45, p. 1-21. (Relatório Técnico do Instituto Oceanográfico).

HARPER, J. L.; HAWKSWORTH, D. L. Preface. In: HAWKSWORTH, D.L. (Ed.). **Biodiversity, Measurement and Estimation.** United Kingdom: Chapman & Hall, London, 1995. p. 5-12.

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.

HASCHEMEYER R. H.; MYERS R. J. Negative staining. In: HAYAT, M. A. (Ed.). **Principles and Techniques of Electron Microscopy--Biological Applications.** New York: Van Nostrand Reinhold, 1972. p. 101-147.

HAVELAAR, A.; W. HOGEBOM. Factors affecting the enumeration of in sewage and sewage polluted waters. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 49, n. 2, p. 387-397, 1986.

HAVELAAR, A. H.; POT-HOGEBOOM, W. M.; FURUSE, K.; POT, R.; HORMANN. M. P. Fspecific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 69, p. 30-37, 1990.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HELDAL, M.; BRATBAK, G. Production and decay of viruses in aquatic environments. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v.72, p. 205-12, 1991.

HENDRIX, R. W. Bacteriophage evolution and the role of phages in host evolution. In: WALDOR, M. K.; FRIEDMAN, D. I.; ADHYA, S. L. (Ed.). **Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology.** Washington DC: ASM Press, 2005. p. 55-65.

HERSHEY, A.D. **The bacteriophage lambda.** New York: Cold Spring Harbor, 1971.

HERNANDEZ-DELGADO, E.A.; SIERRA, M.L.; TORANZOS, G.A. Coliphages as alternate indicators of fecal contamination in tropical waters. **Environ. Toxicol.**, v. 6, p. 131-143, 1991.

HERNANDEZ-DELGADO, E.A.; TORANZOS, G.A. In situ replication studies of somatic and male-specific coliphages in a tropical pristine river. **Water Sci. Technol.**, v.31, p. 247-250, 1995.

HOT, D.; LEGEAY, O.; JACQUES, J.; GANTZER, C.; CAUDRELIER, Y.; GUYARD, K.; LANGE, M.; ANDRÉOLETTI, L. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. **Water Res.**, v. 37, p. 4703-4710, 2003.

HUNTER-CEVERA, J.; KARL, D.; BUCKLEY, M. **Marine Microbial Diversity: the key Earth's habitability**. Washington, D.C.: American Academy of Microbiology, 2005.

HUSS, H. H.; ABABOUC, L.; GRAM, L. **Assessment and management of seafood safety and quality**. Rome: FAO, 2003. 230 p. (FAO Fisheries Technical Paper, n. 444).

IAWPRC STUDY GROUP ON HEALTH RELATED WATER MICROBIOLOGY. Bacteriophages as models viruses in water quality control. **Water Res.**, v. 25, p. 529-545, 1991.

IGNAZITTO F.; VOLTERRA L.; AULICINO F. A.; D'ANGELO A. M. Coliphages as indicators in a treatment plant. **Water Air Soil Pollut.**, v. 13, p. 391-398, 1980.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>. Acesso em 20 mar. 2002.

ISBISTER J. D.; SIMMONS J. A.; SCOTT W. M.; KITCHENS, J. F. A simplified method for coliphage detection in natural waters. **Acta Microbiol. Pol.**, v. 32, p. 197-206, 1983.

JESSUP, C. M.; KASSEN, R.; FORDE, S.E. Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. **Trends Ecol. Evol.**, v.19, p. 189-97, 2004.

JIANG, S. C.; PAUL, J. H. Vital contribution to dissolved DNA in the marine environment as determined by differential centrifugation and kingdom probing. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 317-325, 1995.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, n. 1, p. 80-128, 1991.

KAN, Y.W.; DOZY, A.M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 75, n. 11, p. 5631-5635, 1978.

KAPER, J.; LOCKMAN, H.; COLWELL, R.; JOSEPH, S. Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, p. 91-103, 1979.

KARAOLIS, D.; JOHNSONS, J.; BAILEY, C.; BOEDEKER, E.; KAPER, J.; REEVES, P. *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 3134-3139, 1998.

KARAOLIS, D.; KAPER, J. Pathogenicity islands and other mobile virulence elements to *Vibrio cholerae*. In: KAPER, J.; HACKER, J. (Ed.). **Pathogenicity island and other mobile virulence elements**. Washington: ASM Press, 1999. p.167-187.

KELLOGG, C.A.; ROSE, J. B.; JIANG, S. C.; TURMOND, J. M.; PAUL, J. H. Genetic diversity of related vibriophages isolated from marine environments around Florida and Hawaii, USA. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 120, p. 89-98, 1995.

KENARD, R. P.; VALENTINE, R. S. Rapid determination of the presence of enteric bacteria in water. **Appl. Microbiol.**, v. 14, p. 487-487, 1974.

KORNBERG, A. **DNA replication**. San Francisco: Freeman, 1980.

KOTT, Y.; ROZE, N.; SPERBER, S.; BETZER, N. Bacteriophages as viral pollution indicators. **Water Res.**, v. 8, p. 165-171, 1974.

KOTT, Y. Viruses and bacteriophages. **Sci. Total Environ.** v. 18, p. 13-23, 1981.

KVINGE, T. On the special currents and water levels variations in the Channel of São Sebastião. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 16, p. 23-38, 1967.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; OODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. England: John Wiley & Sons, Chichester, 1991. p. 115-163.

LEVINE, J. A. **Viruses**. Library of congress. Scientific American Library. 1939.

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.

LOCKETT, T. A bacteriophage λ DNA purification procedure suitable for the analysis of DNA from either large or multiple small lysates. **Anal. Biochem.** v.185, n. 2, p. 230-234, 1990.

LOESSNER, M. J.; NEUGIRG, E.; ZINK, R.; SCHERER, S. Isolation, classification and molecular characterization of bacteriophages for Enterobacter species. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 2627-2633, 1993.

LOH, C. L.; JANGI, M. S.; HO, Y. C.; NGEOW, N. F.; WANG, C. W. Development of a field test kit for coliphage detection in natural waters. **Toxicity Assess.**, v. 3, p. 451-460, 1988.

LOUWS, F.J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J. Assessing genetic diversity of microbes using repetitive-sequence-based PCR (rep-PCR). In: TORANZOS, G. (Ed.). **Nucleic Acid Amplifications Methods for the Analysis of Environmental Samples**. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1996. p. 63-94.

LURIA, S. E.; DARNELL, J.E.; BALTIMORE, D.; CAMPBELL, A. **General Virology**. New York: Wiley, 1978.

LWOFF, A. Lysogeny. **Bact. Rev.**, v. 17, p. 269, 1953.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. **Brock biology of microorganisms**. 11th ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2006.

MAHIQUES, M. M. Dinâmica sedimentar atual nas enseadas da região de Ubatuba, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 43, n. 2, p. 111-122, 1995.

MARKMAN, C. **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**. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

MARTINS, M. T.; EI-SHARA AWI, A.; DUTKA, B. J.; PELLIZARI, V. H.; ALFREDO, G.; RIBEIRO, G.; MATSUMOTO, E. F. Coliphage association with coliform indicators: a case study-Brazil. **Toxicity Assess.**, v. 4, p. 329-338, 1989.

MARTINS, M. T.; PELLIZARI, V. H.; DUTKA, B. J. Evaluation of coliphage tests and others simple microbiological methods for the examination of drinking water and classification of water sources. In: DUTKA, B. J.; E L-SHAARAWI, A.H. (Ed.). **Use of simple, inexpensive microbial water quality tests**. Canadá: IDRC, 1990.

MARTINS, M. T.; PELLIZARI, V. H.; PACHECO, A.; MYAKI, D. M.; ADAMS, C.; BOSSOLAN, N. R. S.; MENDES, J. M.; HASSUDA, S. Bacteriological quality of groundwaters in cemeteries. **Rev. Saúde Pública.**, v. 25, p. 47-52, 1991.

MARTINS, M. T.; RIVERA, I. G.; CLARK, D. L.; OLSON, B. H. Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples by DNA probes and recovery of toxin-bearing strains in minimal o-Nitrophenol- β -D-Galactopyranoside-4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronide media. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 3095-3100, 1992.

MARTINS, S.; TONETTO, P.; STEFANUTTI, R.; GATTI, M.; CORAUCCI FILHO, B.; MEHNERT, D. Viral particles removal from urban wastewater by anaerobic process and overland flow system treatment. **Virus Rev. Res.**, v. 8, n. EV 1, p. 99-100, 2003. Abstract.

MARTINS, C. C. **Marcadores Orgânicos Geoquímicos em testemunhos de sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP: um registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho**. 215 f. Tese (Doutorado em Oceanografia) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MATTÉ, G. R.; MATTE, M. H.; SATO, M. I.; SANCHEZ, P. S.; RIVERA, I. G.; MARTINS, 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.

MEDEIROS, P. M. **Avaliação da origem de hidrocarbonetos em sedimentos marinhos de Santos e São Sebastião, utilizando-se hidrocarbonetos marcadores geoquímicos**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 140-143, 1993.

MEKALANOS, J. Cholera toxin: Genetic analysis, regulation and role pathogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 118, p. 97-118, 1985.

MENDES, F.M. **Estrutura da comunidade macrozoobentônica na região de influência do Terminal Amirante Barroso (TEBAR) no Canal de São Sebastião (SP, Brasil)**. 75 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MANDILARA, G.; SMETI, E.; MAVRIDOU, A.; LAMBIRI, M.; VATOPOULOS; RIGAS, F. Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 263, p. 119-126, 2006.

MEZA, R; MONROY, A. **Estudio de estabilidad del método de criopreservación em glicerol al 10% v/v para el establecimiento de um banco de microorganismos**. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Microbiologia, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2002.

MILLER, R.; RIPP, S.; REPLICON, J.; OGUNSEITAN, O.; KOKJOHN, T. Virus mediated gene transfer in fresh water environments. In: GAUTIER, M. (Ed.). **Meeting on bacterial genetics and ecology**. (BAGECO-3). Berlin, Germany: Springer Verlag, 1991. p 51-62.

MILLER, R. Methods for enumeration and Characterization of bacteriophages from environmental samples. In: BURLAGE, R.; ATLAS, R.; STAHL, R.; GEESEY, G.; SAYLER, G. (Ed.). **Techniques in microbial ecology**. New York: Oxford University Press, 1998.

MORIÑIGO, M. A.; WHEELER, D.; BERRY, C.; JONES, C.; MUNOZ, M. A.; CORNAX, R.; BORREGO, J. J. Evaluation of different bacteriophage groups as faecal indicators in contaminated natural waters in Southern England. **Water Res.**, v. 26, p. 267-271, 1992.

MUNIESA, M. T. **Bacteriófagos portadores del gen de la STX2 en aguas**. Tese (Doctorado en microbiologia ambiental y Biotecnologia) - Departamento de Microbiologia, Universidade de Barcelona, Barcelona. 1999.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H.; GHABRIAL, S.; JARVIS, A.; MARTELLI, G.; MAYO, M.; SUMMERS, M. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. **Arch. Virol.**, v. 10, p. 1-585, 1995.

NAGATA, T. Organic matter-bacteria interactions in seawater. In: KIRCHMAN, D. (Ed.). **Microbial ecology of the oceans**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2008. p. 207-241.

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

OHASHI, M.; SHIMADA, T.; FULCUMI, H. "In vitro" production of enterotoxin and hemorrhagic principle by *V. cholerae* NAG. Japan. **J. Med. Sc. and Biol.**, v. 25, p.179-194, 1972.

OLIVEIRA, M. R.; GUIMARÃES, W. V.; ARAÚJO, E. F.; BORGES, A. C. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cheese whey. **Rev. Microbiol.**, v. 26, p. 1-5, 1995.

OSAWA, S.; FURUSE, K.; WATANABE, I. Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, p. 164-168, 1981.

PAUL, J. H.; KELLOGG, C. A. Ecology of bacteriophages in nature. In: HURST, C. (Ed.). **Viral Ecology**. New York: Academic Press, 2000. p. 211–246.

PAUL, J. H.; ROSE, J. B.; JIANG, S. C.; KELLOGG, C. A.; DICKSON, L. Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p.718–724, 1993.

PAUL, J. H.; WILLIAMSON, S. J.; LONG, A.; AUTHEMENT, R.; NATHAN, J.; DAVID, S. ANCA, M.; ROHWER, F. L.; ANDROLEWICZ, M.; PATTERSON, S. Complete Genome Sequence of {phi} HSIC, a Pseudotemperate Marine Phage of *Listonella pelagia*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 3311-3320, 2005.

PAULI, V.; MONEZI, T.; MOSCA, X.; GARRAFA, P.; HÁRSI, C.; MEHNERT, D. Distribution of rotavirus G1-G5 genotypes in domestic effluent and creek in São Paulo city from 2000 to 2001. **Virus Res.**, v. 8, n. EM 2, p.93, 2003. Abstract.

PAYMENT, P.; ARMON, R. Virus removal by drinking water treatment processes. **CRC Crit. Rev. Environ. Control**, v. 19, p. 15–31, 1989.

PAYMENT, P.; FRANCO, E. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2418–2424, 1993.

PEDROSO, D. **Fatores que podem interferir na detecção de colifagos, indicador microbiológico da qualidade de água**. São Paulo. 130 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 1993.

PEDROSO, D.; MARTINS, M. Ultra-morphology of coliphages isolated from water. **Water Res.**, v. 29, n. 4, p. 1199-1202, 1995.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiology: Concepts and applications**. New York: McGraw-Hill, 1993.

PIRES-VANIN, A. M. S.; MATSSURA, Y. Estrutura e função do ecossistema de plataforma continental da região de Ubatuba, Estado de São Paulo: uma introdução. **Publicação Especial do Instituto Oceanográfico**, v. 10, p. 1-8, 2003.

POND, K. **Water recreation and disease. Plausibility of associated infections: Acute effects, sequelae and mortality (emerging issues in water and infectious diseases series).** Washington, D.C.: WHO, 2005. 239 p.

PRIMROSE, S. B.; SEELEY, N. D.; LOGAN, K. B.; NICOLSON, J. W. Methods for studying aquatic bacteriophage ecology. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 43, p. 694-701, 1982.

PROCTOR, L. M.; FUHRMAN, J. A. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. **Nature**, v. 343, p. 60–2, 1990.

QUEIROZ, A.; SANTOS, F.; SASSAROLI, A.; HÁRSI, C.; MONEZI, T.; MEHNERT, D. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 4614-4618, 2001.

QUIÑONES, M.; DAVIS, B.; WALDOR, M. Activation of the *Vibrio cholerae* SOS Response Is Not Required for Intestinal Cholera Toxin Production or Colonization. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 2, p. 927–930, 2006.

QUIÑONES, M.; KIMSEY, A.; WALDOR, M. *LexA* cleavage is required for CTX prophage induction. **Mol. Cell**, v. 17, p. 291–300, 2005.

RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. Characterization and classification microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. (Ed.). **DNA Markes: protocols, applications and overviews.** New York: J. Wiley & Sons, 1997. p. 151-171.

RICCA, D.; COONEY, J. Coliphages and indicator bacteria in Boston Harbor, Massachusetts. **Environ. Toxicol.**, v. 14, p. 404- 408, 1999.

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, n. 8, p. 2898-2904, 1995.

RIVERA, I.; MARTINS, M. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. **Rev. Ciências Farmac., UNESP**, v. 17, p. 115-136, 1996.

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.; CHUN, J.; HUQ, A.; SACK, B.; COLWELL, R. R. Method for DNA extraction and application of multiplex PCR to detect toxigenic *V. cholerae* O 1 and O139 in aquatic ecosystems. **Environ. Microbiol.**, v. 5, p. 599-603, 2003.

RIVERA, I. N. G.; PAULA, C. R.; SOUZA, C. P. Microbiologia Aquática Marinha. In: **Microbiologia Ambiental.** MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). 2ª. Ed. Jaguaruna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. p.609-627.

ROSE, J. B.; EPSTEIN, P. R. ; LIPP, E. K.; SHIERMAN, 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, p. 36-67, 2001.

RUBIN, A. **Pesquisa de *Vibrio cholerae* na água de mar e zooplâncton na região costeira de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo.** 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RUIZ, G.; FOFONOFF, P.; CARLTON, J.; WONHAM, M.; HINES, A. Invasion of coastal marine communities in North America: Apparent patterns, processes and biases. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 3, p. 481-531, 2000.

SAHA, P.; KOLLEY, H.; NAIR, G. Purification and characterization of an extracellular secretogenic non-membrane-damaging cytotoxin produced by clinical strains of *Vibrio cholerae* non-O1. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 3101-3108, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, F.; VIEIRA, M.; HÁRSI, C.; MEHNERT, D. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) for characterization of adenoviruses present in wastewater samples in São Paulo city, Brazil. **Virus Rev. Res.**, v. 6, n. EV 7, p.98, 2001. Abstract.

SASSAROLI, A.; GARRAFA, P.; SANTOS, F.; HÁRSI, C.; VIEIRA, M.; MONEZI, T.; BARARDI, C.; MEHNERT, D. Detection of hepatitis A in wastewater samples in São Paulo city, Brazil. **Virus Rev. Res.**, v. 5, n. HE 1, p.100, 2000. Abstract.

SASSI, R.; KUTNER, M. B. Variação Sazonal do Fitoplâncton da Região do Saco da Ribeira (Lat. 23°30'S – Long. 45°06'W), Ubatuba, Brasil. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 31, p. 29-42, 1982.

SEELEY, N. D.; PRIMROSE, S. B. Concentration of bacteriophages from natural waters. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 46, p. 103-116, 1979.

SEELEY, N. D.; PRIMROSE, S. B. The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. **J. Gen. Virol.**, v. 46, p. 87-95, 1980.

SERWER, P.; HAYES, S. J. THOMAS, J. A.; HARDIES, S. C. Propagating the missing bacteriophages: a large bacteriophage in a new class. **Virol. J.**, v. 4, p. 21–25, 2007.

SEYFRIED, P.; TOBIN, R.; BROWN, E.; NESS, P. A prospective study of swimming-related illness. II. Morbidity and the microbiological quality of water. **Am. J. Public Health**, v.75, n. 9, p. 1071-1075, 1985.

SHIBATA, T.; SOLO-GABRIELE, H.M.; FLEMING L.E.; ELMIR. S. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. **Water Res.**, v, 38, n.13, p. 3119-3131, 2004.

SILLANKORVA, S.M. **Utilização de bacteriófagos no controle de células suspensas e biofilmes de *Pseudomonas fluorescens***. 125 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Praga- Portugal, 2004.

SILVA, L. S. **Estudo numérico da circulação e da estrutura termohalina no Canal de São Sebastião**. 256 f. Tese (Doutorado em Oceanografia) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SIMKOVA, A.; CERVENKA, J. Coliphages as ecological indicators of enteroviruses in various water systems. **Bull. WHO**, v. 59, p. 611-618, 1981.

SINTON, L.; FINLAY, R.; LYNCH, P. Sunlight Inactivation of Fecal Bacteriophages and Bacteria in Sewage-Polluted Seawater. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 8, p. 3605-3613, 1999.

SMITH, H.; GREEN, P.; PARSELL, Z. Vero cell toxins in Escherichia coli, and related bacteria: transfer by phage and conjugation, and toxic action in laboratory animals, chickens, and pigs. **J. Gen. Microbiol.**, v.129, p.3121-3137, 1983.

SOBSEY, M.; BATTIGELLI, D.; HANSZEL, T.; SCHWAB, K. **Male specific coliphages as indicators of viral contamination of drinking water**. USA, AWWA Research Foundation, 1995. 150 p.

SPENCER, R. Marine bacteriophage. **Nature**, v. 175, p. 690-1, 1955.

SULLIVAN, M.B.; WATERBURY, J.B.; CHISHOLM, S.W. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium Prochlorococcus. **Nature**, v. 424, p. 1047-51, 2003.

SUNDRAM, A.; DONNELLY, L.; EHLERS, M.; VREY, A.; GRABOW, W.; BAILEY, I. Evaluation of F-RNA coliphages as indicators of viruses and the source of faecal pollution. Water SA Special Edition. **WISA**, 2002. In press. Available from: <<http://www.wrc.org.za>>. Acesso em:

SUTTLE, C. A.; CHAN, A. M.; COTTRELL, M. T. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. **Nature**, v. 347, p. 467-9, 1990.

SUTTLE, C. A. Viruses in the sea. **Nature**, v. 437, p. 356-61, 2005.

TANTILLO, G. M.; FONTANAROSA, M.; DiPINTO, A.; MUSTI, M. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. **Lett. Appl. Microbiol.**, 39, n. 2: 117-26, 2004.

TAYLOR, R.; MILLER, V.; FURLONG, D.; MEKALANOS, J. The use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 84, p. 2833-2837, 1987.

- TAYLOR, R. Virus on virus infects bacterium. **Nature**, v. 399, p. 312-313, 1999.
- THINGSTAD, F.; BRATBAK, G.; HELDAL, M. Aquatic phage ecology. In: ABEDON, S. (Ed.). **Bacteriophage ecology**. Population growth, evolution, and impact of bacterial viruses. New York: Cambridge University Press, 2008. p. 251-280.
- THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Taxonomy of the Vibrios. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Ed.). **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C.: ASM Press, 2006. p. 29-43.
- THOMPSON, J. R.; POLZ, M. F. Dynamics of *Vibrio* Populations and their role in environmental nutrient cycling. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Ed.). **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C.: ASM Press, 2006. p.190-203.
- TILMAN, D.; LEHMAN, C. **Biodiversity, composition, and ecosystem processes: theory and concepts**. In: KINZIG, A. P., PACALA, S. W., TILMAN, D. (Ed.). The Functional Consequences of Biodiversity, Empirical and Theoretical Extensions. Monographs in Population Biology 33. Princeton: Princeton University Press, 2001. p. 9-41.
- UNITED NATIONS. **Water: a shared responsibility. The United Nations world water development report 2**. Washington, D.C.: UNESCO-WWAP, 2006. 584 p.
- UNITED NATIONS. **Atlas of Oceans**. Washington, D.C.: UN, 2008. Disponível em: <<http://www.oceansatlas.org>>. Acesso em: 20 mar. 2009.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ambient water quality criteria for bacteria-1986**. Office of water regulation and standards, criteria and standards division. Washington, D.C.: EPA, 1986, v. 440/5-84/002.
- URAKAWA, H.; RIVERA, I. N. G. Aquatic Environment. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Ed.). **The Biology of Vibrios**. Washington, D.C.: ASM Press, 2006. p. 175-189.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MCGEOCH, D. J.; MANILOFF, J. **Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses**. San Diego, CA: Academic Press, 2000. (Seventh ICTV Report).
- VAUGHN, J. M.; METCALF, T. G. Coliphages as indicators of enteric viruses in shellfish and shellfish raising estuarine waters. **Water Res.**, v. 9, p. 613-616, 1975.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In: BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R.; WEINSTOCK, G.M. (Ed.). **Bacterial Genomes: physical structure and analysis**. New York: Chapman and Hall, 1998. p. 437-454.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2.ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1996. p. 243.

WADE, T.; PAI, N.; EISENBERG, J.; COLFORD J. R., J. Do U. S. Environmental Protection Agency Water Quality Guidelines for recreational water prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. **Environ. Health Perspect.**, v. 111, p. 1102-1109, 2003.

WAGNER, E.W.; HEWLETT, M. **Basic Virology**. New York: Blackwell Science, 1999.

WALDOR, M.; MEKALANOS, J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, v. 272, p.1910-1914, 1996.

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, p.127-181, 2004.

WEN, K.; ORTMANN, A. C.; SUTTLE, C. A. Accurate estimation of viral abundance by epifluorescence microscopy. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 3862–7, 2004.

WENTSEL, R. S.; O'NEILL, P. O.; KITCHENS, J. F. Evaluation of coliphage detection as a rapid indicators of water quality. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 43, p. 430-434, 1982.

WILHELM, S. W.; POORVIN, L. Quantification of algal viruses in marine samples. **Methods Microbiol.**, v. 30, p. 53–65, 2001.

WILSON, E. O.; PETER, F.M. (Ed.). **Biodiversity**. Washington, D.C.: National Academic Press, 1988.

WILSON, W.; JOINT, I.; CARR, N.; MANN, N. Isolation and molecular characterization of five marine cyanophages propagated on *Synechococcus* sp. Strain WH7803. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3736-3743, 1993.

WOMMACK, K.; HILL, R.; KESSEL, M.; RUSSEK-COHEN, E.; COLWELL, R. Distribution of viruses in the Chesapeake Bay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p. 2965-2970, 1992.

WOMMACK, K.; COLWELL, R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 1, p. 69-114, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Using climate to predict infectious disease outbreaks: a review**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004. 55 p.

ZEPH, L.; ONAGA, M.; STOTZKY, G. Transduction of *Escherichia coli* by bacteriophage P1 in soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p.1731-1737, 1988.

ZINNAKA, Y.; CARPENTER, C. An enterotoxin produced by non cholera Vibrios. **Johns Hopkins Med. J.**, v. 131, p. 403-410, 1972.

ZOON, K.C.; HABERSAT, M.; SCOCCA, J. J. Synthesis of envelope polypeptides by *Haemophilus influenzae* during development of competence for genetic transformation. **J. Bacteriol.**, v. 127, p.545-554, 1976.

ANEXOS

Anexo A - Identificação por seqüenciamento dos isolados presuntivos de serem *V.cholerae*, usando o Genbank do BLAST e RDP II.

Isolado	Seqüenciamento	Número De acesso	Score máximo	Cobertura	Similaridade com o Gene Bank BLAST	Seqüenciamento	Número de acesso	Score maxima	Similaridade com o Gene Bank RDP II
V1	<i>Vibrio harveyi</i> WG1702 16S	FJ154796.1	929	100	96	<i>Vibrio</i> sp. RW49	EU419936	1269	87
V10	<i>Vibrio proteolyticus</i>	AF513463.1	1081	100	99	<i>V.fluviialis</i> NCTC 11327T	X76335	1445	99
V11	<i>Vibrio rotiferianus</i>	FM204863.1	1088	100	99	<i>V.harveyi</i> 642	DQ005911	1313	99
V12v	<i>Vibrio olivaceus</i>	AY827492.1	853	80	97	Bactéria não cultivada SMA2	HQ061227-1	1366	74
V13	<i>V.furmissii</i> (ATCC 35016 T)	X76336.1	1059	100	98	<i>Vibrio</i> sp. V859	DQ146996	1418	96
V14	<i>Vibrio diabolicus</i>	X99762.2	1083	100	99	<i>Vibrio</i> sp.CJ11052	AF500207	1440	98
V15	<i>Vibrio campbellii</i>	FM204855.1	1075	100	99				
V16	<i>Vibrio campbelli</i> cepa R1117	FM204855.1	1027	99	97	<i>V.rumoiensis</i> UDPI	AY332407	1450	90
V17	<i>Vibrio splendidus</i> cepa 01/060	AJ874356.1	136	30	100	<i>V.paraaemolyticus</i> 21	AY245190	1312	97
V2	<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT 609	FM204870.1	1083	100	99	Bactéria K2-74	AY345403	1382	98
V20	<i>Vibrio rotiferianus</i>	FM204863.1	1081	100	99	<i>V.harveyi</i> 642	DQ005911	1313	98
V21	<i>Vibrio rotiferianus</i>	FM204863.1	1075	100	99	<i>V.harveyi</i> HQ050227-1	EF635306	1375	98
V22	<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	AB297941.1	952	100	95	<i>V.nigripulchritudo</i> FPC1062	AB297941	1456	80
V23	<i>Vibrio campbelli</i> cepa R1117	FM204855.1	1059	99	99	<i>V.harveyi</i> OVL	AY264926	1295	96
V28	<i>Vibrio</i> sp.	FJ457534.1	331	76	80	Bactéria não cultivada aab37b09	DQ814286	1381	33
V3	<i>Vibrio campbellii</i> cepa SG358	EU652252.1	1075	100	99	<i>V.xuii</i> (T) R-15052	AJ316181	1348	98
V30	<i>Vibrio proteolyticus</i>	AF513463.1	1059	100	98	<i>Vibrio</i> sp. V859	DQ146996	1418	97
V32	<i>Vibrio campbelli</i> partial16S rRNA gene, cepa R1117	FM204855.1	1083	100	99	<i>V.rumoiensis</i> UDP1	AY332407	1450	98
V33	<i>Vibrio natriegens</i> strainCM3 16S	EU660320.1	1050	100	98	<i>V. natriegens</i> 01/252	AJ874353	1426	93
V34	<i>Vibrio proteolyticus</i>	AF513463.1	1070	100	99	<i>V.fluviialis</i> NCTC 11327T	X76335	1442	97
V36	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.GAS8	EF584050.1	1068	100	99	<i>Vibrio</i> sp. 5G4	EU517619	1253	96
V38	<i>Vibrio vulnificus</i> clone 09 G05 16S	EF546306.1	1068	100	99	<i>V.vulnificus</i> Vv34 09 B08	EF546295	1286	96
V39	<i>Vibrio vulnificus</i> clone 09 H04	EF546308.1	872	100	93	<i>V.vulnificus</i> Vv34 09 B08	EF546295	1286	79
V4	<i>Vibrio natriegens</i> , cepa CECT 7466, CECT 7466	FM999825.1	1086	100	99	<i>V.hepatarius</i> (T) tipo LMG 20		1371	99
V40	<i>Vibrio agarivorans</i> cepa 351A, CECT 5084	AJ310648.1	656	94	87	<i>Vibrio</i> sp. Me1 não cultivado	DQ917856	1420	54
V41	<i>Vibrio natriegens</i> cepa CECT	FM999825.1	1077	100	99	<i>V.alginolyticus</i> A3G-2	DQ995519	1382	98
V42	<i>Vibrio campbelli</i> cepa R1117	FM204855.1	1057	100	98	<i>V.rumoiensis</i> UDP1	AY332407	1450	96
V43	<i>Vibrio diabolicus</i>	X99762.2	1020	100	97	<i>Vibrio</i> sp. NLEP97-1598	AF410778	1418	88

Isolado	Seqüenciamento	Número de acesso	Score máximo	Cobertura	Similaridade com o Gene Bank BLAST	Seqüenciamento	Número de acesso	Score máximo	Similaridade com o Gene Bank RDP II
V44	<i>Vibrio rotiferianus</i> cepa LPD 1186	FM204864.1	874	97	93	<i>Vibrio</i> sp. V639	AM930485	1393	73
V5	<i>Vibrio olivaceus</i>	AY827492.1	1085	100	99	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. damsela	AB032015	1437	99
V50	<i>Vibrio olivaceus</i>	AY827492.1	1062	100	99	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. damsela	Y18496	1399	96
V6SP2	<i>Vibrio natriegens</i> cepa CECT 7466,CECT 7466	FM999825.1	1081	100	99	<i>Vibrio</i> sp.CJ11052	AF500207	1402	98
V7	<i>Vibrio campbellii</i> cepa R1117	FM204855.1	1075	100	99	<i>V.rumoiensis</i> (T) S-1	AB013297	1413	97
V8	<i>Vibrio campbellii</i> cepa R1117	FM204855.1	1081	100	99	<i>V.rumoiensis</i> UDP1	AY332407	1450	98
V9	<i>Vibrio proteolyticus</i>	AF513463.1	1086	100	99	<i>V.fluvialis</i> NCTC 11327T	X76335	1445	99
VSSP1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> cepa CT12	EU660364.1	1072	100	99	<i>Vibrio</i> sp. CN87	EU413955	1358	97

Anexo B – Análise estatística da viabilidade celular das cepas clínicas de *V.cholerae* conservadas em glicerol.

Cepas clínicas-Glicerol 30%

1way ANOVA Column statistics		A	B	C	D	E	F	G
		glic30-0	glic30-2	glic30-4	glic30-6	glic30-8	glic30-10	glic30-12
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	8	8	8	8	8	8	8
2	Minimum	1200000	4000	8000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	25% Percentile	1550000	65000	16500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4	Median	9000000	900000	40000	2200	207.0	72.50	38.50
5	75% Percentile	45000000	2000000	160000	20000	6425	682.5	83.50
6	Maximum	72000000	22000000	160000	40000	8900	870.0	98.00
7								
8	Mean	20350000	3493000	76250	9550	2477	278.1	41.38
9	Std. Deviation	27580000	7526000	70300	14770	3711	364.5	42.94
10	Std. Error	9750000	2661000	24860	5224	1312	128.9	15.18
11								
12	Lower 95% CI	-2705000	-2799000	17480	-2802	-625.6	-26.64	5.474
13	Upper 95% CI	43410000	9785000	135000	21900	5579	582.9	77.28

Cepas clínicas-Glicerol 20%

1way ANOVA Column statistics		A	B	C	D	E	F	G
		glic20-0	glic20-2	glic20-4	glic20-6	glic20-8	glic20-10	glic20-12
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	8	8	8	8	8	8	8
2	Minimum	1200000	670000	45680	4500	5600	78.00	10.00
3	25% Percentile	1550000	2575000	410000	54500	36000	9775	595.3
4	Median	9000000	5500000	715000	93950	55000	59000	9700
5	75% Percentile	45000000	27000000	4225000	612500	441500	81000	65500
6	Maximum	72000000	65000000	5500000	2300000	560000	670000	110000
7								
8	Mean	20350000	15550000	1974000	464000	202500	121700	29720
9	Std. Deviation	27580000	22490000	2151000	777800	230100	223600	41710
10	Std. Error	9750000	7952000	760500	275000	81340	79060	14750
11								
12	Lower 95% CI	-2705000	-3258000	176100	-186200	10120	-65230	-5151
13	Upper 95% CI	43410000	34350000	3773000	1114000	394800	308700	64590

Anexo C – Análise estatística da viabilidade celular das cepas ambientais de *V.cholerae* conservadas em glicerol.

Cepas ambientais-Glicerol 30%

1way ANOVA Column statistics		A	B	C	D	E	F	G
		glic30-0	glic30-2	glic30-4	glic30-6	glic30-8	glic30-10	glic30-12
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	10	10	10	10	10	10	10
2	Minimum	4000	3000	30.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	25% Percentile	92000	7250	162.5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4	Median	2800000	230000	105000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
5	75% Percentile	96000000	6000000	525000	14250	706.0	189.8	15.50
6	Maximum	160000000	7000000	900000	160000	4580	890.0	678.0
7								
8	Mean	38790000	2454000	253600	19520	683.7	159.7	71.80
9	Std. Deviation	57530000	3091000	315400	49990	1477	328.3	213.1
10	Std. Error	18190000	977300	99750	15810	467.1	103.8	67.40
11								
12	Lower 95% CI	-2369000	242700	27980	-16240	-373.0	-75.16	-80.67
13	Upper 95% CI	79950000	4664000	479300	55280	1740	394.6	224.3

Cepas ambientais-Glicerol 20%

1way ANOVA Column statistics		A	B	C	D	E	F	G
		glic20-0	glic20-2	glic20-4	glic20-6	glic20-8	glic20-10	glic20-12
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	10	10	10	10	10	10	10
2	Minimum	4000	6700	5600	340.0	110.0	678.0	100.0
3	25% Percentile	92000	86000	45500	40400	1434	2383	4975
4	Median	2800000	1035000	78000	72500	37500	17550	9350
5	75% Percentile	96000000	7375000	2193000	285000	69250	51500	38750
6	Maximum	160000000	89000000	7600000	1200000	320000	260000	90000
7								
8	Mean	38790000	11290000	1568000	231900	61250	44790	25650
9	Std. Deviation	57530000	27500000	2825000	366100	95750	78890	34420
10	Std. Error	18190000	8695000	893200	115800	30280	24950	10880
11								
12	Lower 95% CI	-2369000	-8381000	-452800	-30030	-7244	-11640	1029
13	Upper 95% CI	79950000	30960000	3589000	493800	129700	101200	50270