LIGIA CAROLINA LAVEZZO

CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE VIBRIOS ISOLADAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR, PLÂNCTON E BIVALVES DA ZONA LITORÂNEA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2015

LIGIA CAROLINA LAVEZZO

CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE VIBRIOS ISOLADAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR, PLÂNCTON E BIVALVES DA ZONA LITORÂNEA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profª. Drª. Ana Clara G. Schenberg

Orientadora: Profª. Drª. Irma N. G. Rivera

Versão Corrigida. A versão original encontra-se disponível na tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Lavezzo, Lígia Carolina.
Caracterização das espécies de vibrios isoladas em amostras de água do mar, plâncton e bivalves da zona litorânea do Estado de São Paulo / Lígia Carolina Lavezzo. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Microbiologia ambiental.

Versão do título para o inglês: Characterization of vibrio species isolated from seawater, plankton and bivalves samples from the São Paulo state coastal zone.

1. Vibrio 2. Ecossistema marinho 3. Estado de São Paulo 4. Antibiograma 5. Genes associados à virulência 6. MLSA I. Schenberg, Profa. Dra. Ana Clara Guerrini II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB060/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Lígia Carolina Lavezzo.

Título da Tese: Caracterização das espécies de vibrios isoladas em amostras de água do mar, plâncton e bivalves da zona litorânea do Estado de São Paulo.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg.

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: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **484/11** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização das espécies de vibrios isoladas em amostras de água, plâncton e bivalves da zona litorânea do Estado de São Paulo*" sob a responsabilidade de **Lígia Carolina Lavezzo,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 19 de outubro de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

DEDICATÓRIA

À minha orientadora Professora Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera (*in memorian*) que dedicou a sua vida ao trabalho com os vibrios e que, infelizmente, não pode ver a conclusão desta Tese. Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e outras, ainda, porque nos desafiam a construí-los. Saudade!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar nesta caminhada, pela sua proteção e por me fortalecer nos momentos difíceis.

Aos meus pais, pela minha formação, pelo amor incondicional, paciência e por vibrarem comigo a cada etapa conquistada. À minha irmã, Letícia Fernanda Lavezzo, pelo companheirismo, incentivo e apoio em todos os momentos. Aos meus familiares e amigos, pela torcida e pelo carinho. Obrigada por acreditarem em mim!

À Professora Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera, pela oportunidade oferecida, confiança, pelas portas sempre abertas e pela sua dedicação como orientadora deste trabalho. Muito obrigada pela sua amizade e por todos os ensinamentos transmitidos.

À Professora Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg, por toda sua atenção, gentileza, apoio e pela sua orientação neste trabalho.

À amiga Dra. Claudiana Paula de Souza Sales, por toda a sua colaboração, disposição, simplicidade e calma durante a realização deste projeto. Meu eterno agradecimento.

À amiga Nadia Catalina Alfonso Vargas, pela amizade sincera, amabilidade, educação e por toda a ajuda prestada. Ainda estou esperando o lendário almoço colombiano...

Ao amigo Flávio Augusto Cardozo, pelas palavras de incentivo, pela sua proatividade, pelos almoços e empanadas, histórias e conselhos que, juntamente com a Nadia, deixaram a minha vida mais alegre e, especialmente, por sua amizade. Só posso agradecer muito!

À Zita Maria de Oliveira Gregório e ao Senhor Luiz Constantino Sales, pela atenção, carinho, respeito e por trazerem alegria ao laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular - 150, Bianca, Thiago, Vanessa, Maicon, Cláudia, Gabriel e Caio, pela convivência e amizade.

Aos amigos da 32º Vara Cível, pelo apoio e cordialidade, e em especial, ao Bruno, Mayara, Fabiana, Fátima, João, Janaína e Dra. Érica Pereira de Sousa, pela motivação e companheirismo.

À Universidade de São Paulo - USP e ao Instituto de Ciências Biomédicas - ICB, pela oportunidade de compor seu quadro discente. Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, pela colaboração e auxílio.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 10/52676-0).

E, finalmente, a todos que de alguma maneira ajudaram a concluir este trabalho e me deram o incentivo para levá-lo adiante.

"Somos assim: sonhamos o voo, mas tememos a altura.

Para voar é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio.

Porque é só no vazio que o voo acontece.

O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas.

Mas é isso o que tememos: o não ter certezas.

Por isso trocamos o voo por gaiolas.

As gaiolas são o lugar onde as certezas moram."

Fiódor Dostoiévski, em Os Irmãos Karamazov

RESUMO

LAVEZZO, L. C. **Caracterização das espécies de vibrios isoladas em amostras de água do mar, plâncton e bivalves da zona litorânea do estado de São Paulo**. 2015. 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os micro-organismos são essenciais para o meio ambiente e contribuem para a estabilidade dos ecossistemas. Sabe-se que as bactérias do gênero *Vibrio* são autóctones do ecossistema marinho, e, embora a diversidade e a patogenicidade estejam sendo descritas para diversas espécies, os problemas de saúde pública são devidos, geralmente, a *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. A proposta deste estudo foi caracterizar ao nível molecular as espécies de *Vibrio* isoladas de amostras de água do mar, plâncton e bivalves, coletadas no Canal de São Sebastião (n=78), Baixada Santista (n=37) e Ubatuba (n=17), analisar a susceptibilidade destes vibrios aos antibióticos e os principais genes associados à virulência (*ctxA, tcpA, stn/sto, tdh, trh*), além de relacionar os resultados obtidos com as diferenças espaciais e as atividades antropogênicas existentes nos locais estudados. Pelo antibiograma, foi possível observar sensibilidade à ciprofloxaxina (100%), ao meropenem (100%), ao ácido nalidíxico (99,2%), à tetraciclina (99,2%), e ao cloranfenicol (97,7%), resistência à ampicilina (62,4%) e à cefalotina (52,6%), além de uma alta porcentagem de múltipla resistência (64,7% em Ubatuba, 48,6% na Baixada Santista e 43% no Canal de São Sebastião) aos antimicrobianos. Os vibrios foram analisados quanto à presença de cinco genes associados à virulência e quatro (3,0%) isolados de água do mar da Baixada Santista foram positivos para o gene de virulência *stn/sto*, sendo três (PF620, PF623-1 e PF623-2) da espécie *V. parahaemolyticus* e um (PF482), *V. alginolyticus*. Pelos resultados obtidos por meio da Análise de Sequência Multilocus (MLSA), com os genes *pyrH*, *recA* e *rpoA*, foi possível identificar quatro espécies de vibrios em Ubatuba, um ambiente aquático com atividade antrópica mínima (*Vibrio alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. campbellii* e *V. harveyi)*; onze espécies de vibrios no Canal de São Sebastião, área com moderado impacto humano (*V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. harveyi*, *V. diabolicus*, *V. atypicus*, *V. coralliilyticus*, *V. maritimus*, *V. parahaemolyticus* e *V. tubiashii*); e, onze espécies na Baixada Santista, área com alta atividade antrópica (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. communis*, *V. maritimus*, *V. fluvialis*, *V. fortis*, *V. natriegens* e *V. navarrensis*).

Palavras-chave: *Vibrio*. Ecossistemas marinhos. Estado de São Paulo. Antibiograma. Genes associados à virulência. MLSA.

ABSTRACT

LAVEZZO, L. C. **Characterization of vibrio species isolated from seawater, plankton and bivalves samples from the São Paulo State coastal zone**. 2015. 104 p. Ph. D. thesis (Biotecnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Microorganisms are vital to the environment and play an important role in the stability of ecosystems. Bacteria of the genus *Vibrio* are autochthones of marine ecosystems and, although the diversity and pathogenicity have been described for several species, public health problems are generally due to *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*. The purpose of this study was to characterize at the molecular level *Vibrio* species isolated from seawater, plankton and bivalves samples collected from Canal de São Sebastião (n=78), Baixada Santista (n=37) and Ubatuba (n=17), to analyze their antimicrobial susceptibility, the major virulence-associated genes (*ctxA, tcpA, stn/sto, tdh, trh*) and to bring these results into relation with the different levels of anthropogenic activity of the studied sites. The antimicrobial susceptibility tests showed sensitivity to ciprofloxacin (100%), meropenem (100%), nalidixic acid (99.2%), tetracycline (99.2%), chloramphenicol (97.7%), resistance to ampicillin (62.4%) and cephalothin (52.6%), and a significant percentage of multidrug resistance (64.7% in Ubatuba, 48.6% in Baixada Santista, and 43% in Canal de São Sebastião). Five virulence-associated genes were examined and four (3.0%) seawater isolates collected from Baixada Santista proved positive for *stn/sto*, three of them were identified as *V. parahaemolyticus* (PF620, PF623-1 and PF623-2) and one, as *V. alginolyticus* (PF482). MLSA allowed the identification of four *Vibrio* species from Ubatuba, an environment of the coastal region with low anthropogenic activities: *V. alginolyticus* (n=7), *V. fluvialis* (n=5), *V. campbellii* (n=3), and *V. harveyi* (n=2). In Canal de São Sebastião, an area with medium anthropogenic activities, eleven species were identified: *V. fluvialis* (n=30), *V. alginolyticus* (n=24), *V. campbellii* (n=8), *V. rotiferianus* (n=5), *V. harveyi* (n=4), *V. diabolicus* (n=2), *V. atypicus* (n=1), *V .coralliilyticus* (n=1), *V. maritimus* (n=1), *V. parahaemolyticus* (n=1), and *V. tubiashii* (n=1). In Baixada Santista, an area with high anthropogenic activities, the eleven identified species were: *V. alginolyticus* (n=11), *V. parahaemolyticus* (n=8), *V. rotiferianus* (n=4), *V. campbellii* (n=3), *V. harveyi* (n=3), *V. communis* (n=2), *V. maritimus* (n=2), *V. fluvialis* (n=1), *V. fortis* (n=1), *V. natriegens* (n=1), and *V. navarrensis* (n=1).

Keywords: *Vibrio*. Marine ecosystems. State of São Paulo. Antibiogram. Virulence-associated genes. MLSA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(+) – Controle Positivo
(-) – Controle Negativo
°C – grau centígrado (s)
< - Menor que
> - Maior que
≥ - Maior ou igual
% - porcentagem
µg – micrograma
µL – microlitro
µM - micromolar
A – Água do mar
AMP – Ampicilina
ATCC – "American Type Culture Collection"
B – Bivalve (s)
BI – Boa Identificação
BIG – Boa Identificação do Gênero
BAM – "Bacteriological Analytical Manual"
CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CFL – Cefalotina
CFO – Cefoxitina
CIP – Ciprofloxacina
CLO – Cloranfenicol
CLSI – "Clinical Laboratory Standards Institute"
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPM - Cefepima
CPS - Cápsula Polissacarídica
CT – Toxina Colérica
CTX - Cefotaxima
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA – Ácido etileno-diamino tetracético
EI – Excelente Identificação
EST – Estreptomicina
FAO – "Food and Agriculture Organization"
FD – Fraca Identificação
FDA – "Federal and Drug Administration"
GEN – Gentamicina
GNI – Galeria Não Identificável
g – grama
Km – Quilômetro (s)
Km^2 - Quilômetros Quadrados
Kb – Kilobase (s)
n – Número de Isolados
IA – Identificação Aceitável

IAG – Identificação Aceitável do Gênero
IP – Identificação Presuntiva
M – Marcador
MBI – Muito Boa Identificação
MER – Meropenem
$MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio
mL – mililitro
MLSA - Análise de Sequências Multilocus
mM - milimolar
MMA – Ministério do Meio Ambiente
n° - número
NaCl – Cloreto de Sódio
NAG - Enterotoxina Termoestável de *Vibrio cholerae* Não Aglutinável
NAL - Ácido Nalidíxico
ng – nanograma
NCBI – "National Center for Biotechnology Information"
P - Plâncton
pb – Pares de Base
p/v – Peso por Volume
PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase
PD – Perfil Duvidoso
pH – Potencial Hidrogeniônico
PI – Perfil Inaceitável
R – Resistente (s)
RDP – "Ribosomal Database Project"
RNA – Ácido Ribonucléico
rRNA – RNA ribossomal
T – Temperatura
TAE – Tampão Tris-Acetato EDTA
TCBS - Tiossulfato Citrato Bile Sacarose
TCP - Toxina Correguladora do Pilus
TDH - Hemolisina Termoestável Direta
TEBAR - Terminal Petrolífero Almirante Barroso
TET - Tetraciclina
TRH - Hemolisina Termoestável Relativa
TRI - Trimetoprima
S – Salinidade
STh – Enterotoxina Termoestável produzidas por *Escherichia coli* Toxigênica do Homem
STp - Enterotoxina Termoestável produzidas por *E. coli* Toxigênica do Porco
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
USP – Universidade de São Paulo
US$ - Dólar
V - Volt
VBNC – Viável Mas Não Cultivável
WHO – "World Health Organization"

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Mapa do Estado de São Paulo com os locais de coleta das amostras: Canal de São Sebastião, Ubatuba e Baixada Santista.....31

Figura 2- Comportamento bioquímico do isolado PF601, identificado como *V. fluvialis* (Boa Identificação) usando o Sistema de Identificação Bioquímica API 20E.....38

Figura 3- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA de *Vibrio* spp. isolados de Ubatubas com as sequências disponíveis no RDP.....39

Figura 4- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA de *Vibrio* spp. isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no RDP.....40

Figura 5- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA de *Vibrio* spp. isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no RDP.....41

Figura 6- Resultado de amplificação do gene *stn/sto* com 172 pb.....47

Figura 7- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *pyrH* de *Vibrio* spp. isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no NCBI.....48

Figura 8- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *recA* de *Vibrio* spp. isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no NCBI.....50

Figura 9- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoA* de *Vibrio* spp. isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no NCBI.....51

Figura 10- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoD* de *Vibrio* spp. isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no NCBI.....52

Figura 11- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *pyrH* de *Vibrio* spp. isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no NCBI.....56

Figura 12- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *recA* de *Vibrio* spp. isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no NCBI.....58

Figura 13- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoA* de *Vibrio* spp. isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no NCBI.....59

Figura 14- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoD* de *Vibrio* spp. isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no NCBI.....60

Figura 15- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *pyrH* de *Vibrio* spp. isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no NCBI.....63

Figura 16- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *recA* de *Vibrio* spp. isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no NCBI.....64

Figura 17- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoA* de *Vibrio* spp. isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no NCBI.....65

Figura 18- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoD* de *Vibrio* spp. isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no NCBI.....66

Figura 19- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos genes *pyr*H, *rec*A e *rpo*A dos isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no NCBI.....69

Figura 20- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos genes *pyr*H, *rec*A e *rpo*A dos isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no NCBI.....70

Figura 21- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos genes *pyr*H, *rec*A e *rpo*A dos isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no NCBI.....71

Figura 22- Abundância das espécies de vibrios por local de coleta - Ubatuba, Baixada Santista e Canal de São Sebastião.....72

Figura 23- Distribuição das espécies de vibrios por local de coleta - Ubatuba, Baixada Santista e Canal de São Sebastião.....72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para os genes associados à virulência.....33

Quadro 2- Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR dos genes16S rRNA, *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD*.....35

Quadro 3- Espécies sugeridas de *Vibrio* spp. utilizando o Sistema de Identificação Bioquímica API 20E.....38

Quadro 4- Perfil do Sistema de Identificação Bioquímica API 20E dos isolados de *Vibrio* spp. por amostra e local de coleta.....38

Quadro 5- Resistência aos antibióticos de *Vibrio* spp. por amostra e local de coleta.....43

Quadro 6- Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de vibrios da Baixada Santista.....44

Quadro 7- Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de vibrios de Ubatuba.....44

Quadro 8- Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de vibrios do Canal de São Sebastião.....45

Quadro 9- Perfis de susceptibilidade de *Vibrio* spp. por amostra e local de coleta.....46

Quadro 10- Sequenciamento dos genes *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD* dos isolados de vibrios do Canal de São Sebastião.....54

Quadro 11- PCR do gene responsável pela virulência *stn/sto* e resultado do sequenciamento dos genes *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD* dos isolados de vibrios da Baixada Santista.....62

Quadro 12- Sequenciamento dos genes *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD* dos isolados de vibrios de Ubatuba.....67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....18
2.1 O gênero *Vibrio*.....18
2.1.1 Vibrio cholerae.....19
2.1.2 Vibrio parahaemolyticus.....20
2.1.3 Vibrio vulnificus.....20
2.1.4 Outras espécies do gênero Vibrio.....21
2.2 Antibióticos e resistência bacteriana.....22
2.3 Identificação de *Vibrio*.....23
2.4 Ambiente costeiro.....25
2.4.1 Ambiente costeiro do Estado de São Paulo.....26
2.4.1.1 Canal de São Sebastião.....27
2.4.1.2 Baixada Santista.....27
2.4.1.3 Ubatuba – Saco do Ribeira.....27
3 OBJETIVOS.....29
3.1 Objetivo geral.....29
3.2 Objetivos específicos.....29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....30
4.1 Coleta das amostras.....30
4.1.1 Descrição da área de estudo, período de amostragem e pontos de coleta.....30
4.2 Recuperação e identificação bioquímica.....31
4.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....32
4.4 Caracterização molecular.....32
4.4.1 Extração de DNA.....32
4.4.2 Caracterização dos genes associados à virulência.....32
4.4.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA e genes housekeeping.....33
4.4.3.1 Amplificação do gene 16S rRNA.....33
4.4.3.2 Purificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.....34
4.4.3.3 Amplificação dos genes *housekeeping*: *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD* (MLSA).....34
4.4.3.4 Purificação e sequenciamento dos genes *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD* (MLSA).....35
4.4.4 Análises dos resultados.....36
4.4.4.1 Análises das sequências obtidas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e de genes *housekeeping*..... 36
5 RESULTADOS.....37

5.1 Reisolamento e identificação bioquímica.....37
5.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA: determinação do gênero *Vibrio*.....39
5.3 Análise de susceptibilidade aos antimicrobianos.....42
5.3.1 Padronização da metodologia para a determinação da concentração do inóculo e do meio de cultura apropriado em vibrios.....42
5.3.2 Teste de disco-difusão.....42
5.4 Detecção dos genes associados à virulência: *ctxA*, *tcpA*, *stn/sto*, *tdh* e *trh*.....46
5.5 Análise dos sequenciamentos dos genes *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *rpoD*.....47
5.5.1 Canal de São Sebastião.....47
5.5.2 Baixada Santista.....55
5.5.3 Ubatuba.....62
5.6 Análise de sequências multilocus (MLSA).....67
6 DISCUSSÃO.....73
6.1 Isolamento e identificação bioquímica.....73
6.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos.....74
6.3 Genes associados à virulência.....75
6.4 Caracterização molecular utilizando MLSA.....77
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....80
REFERÊNCIAS.....81
APÊNDICES.....100
APÊNDICE 1A- Local, data e ponto da coleta, tipo de amostra e coloração da colônia no meio seletivo TCBS e no CHROMagar dos isolados de vibrios de Ubatuba.....100
APÊNDICE 1B- Identificação bioquímica realizada através do API 20E dos isolados de vibrios de Ubatuba.....100
APÊNDICE 2A- Local, data e ponto da coleta, tipo de amostra e coloração da colônia no meio seletivo TCBS e no CHROMagar dos isolados de vibrios da Baixada Santista.....101
APÊNDICE 2B- Identificação bioquímica realizada através do API 20E dos isolados de vibrios da Baixada Santista.....102
APÊNDICE 3A- Local, data e ponto da coleta, tipo de amostra e coloração da colônia no meio seletivo TCBS e no CHROMagar dos isolados de vibrios do Canal de São Sebastião.....103
APÊNDICE 3B- Identificação bioquímica realizada através do API 20E dos isolados de vibrios do Canal de São Sebastião.....104

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são essenciais para o meio ambiente, contribuem para a estabilidade dos ecossistemas, fazem a ciclagem de compostos químicos, incluindo a degradação de poluentes (STALEY, 1998). Dentre os micro-organismos marinhos, as bactérias do gênero *Vibrio* fazem parte da microbiota autóctone do ecossistema marinho e estuarino, permanecendo tanto no sedimento como na coluna d'água, sendo comumente isolados de peixes e crustáceos, ou associados com plantas, vivendo como simbiontes ou patógenos (DUMONTET et al., 2000).

Essas bactérias são capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (RAMAIAH et al., 2000) e têm um papel importante na reciclagem de quitina no ambiente aquático (HUQ; COLWELL, 1994). Algumas espécies são patogênicas, capazes de causar lesões em organismos marinhos e infecções e gastroenterites em humanos através da exposição de feridas em água ou pelo consumo de água ou frutos do mar crus ou mal cozidos, sendo que as principais espécies diretamente implicadas em surtos de veiculação hídrica e alimentar, segundo a Organização Internacional de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO) são *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

Diante da importância das bactérias no ambiente marinho, o grupo de pesquisa do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, liderado pela Professora Dra Irma Nelly G. Rivera, vem desenvolvendo trabalhos com vibrios, desde 2005, na região costeira do Estado de São Paulo.

No âmbito desta linha de pesquisa, o presente estudo procurou caracterizar as espécies de vibrios isoladas de amostras de água do mar, plâncton e bivalves da Baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba, ecossistemas com diferentes níveis de impacto antropogênico. O conhecimento da dinâmica e diversidade de vibrios deverá trazer benefícios econômicos e estratégicos relacionados com a identificação de micro-organismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos, como na decomposição de quitina e degradação de hidrocarbonetos aromáticos (COLWELL, 1997; SOUZA-SALES, 2009), além do prognóstico e prevenção de doenças emergentes em seres humanos e em animais, em vigilância epidemiológica e em estudos de microbiologia alimentar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O gênero *Vibrio*

A mais impressionante característica da Terra é a existência de vida, e a mais impressionante característica da vida é sua diversidade (CALIMAN, 2005; CHAPIN, 1997). Esta diversidade biológica, ou biodiversidade, é definida como o conjunto de diferenças genéticas, taxonômicas e ecológicas que transcende a escala de genes a ecossistemas (LOREAU et al., 2002; SCHULZE; MOONEY, 1994). Dos grandes ambientes presentes no planeta Terra, os oceanos e mares representam um dos mais importantes, ocupando 71% da superfície terrestre e exercendo uma forte influência no ecossistema global (FIGUEIRA; CUNHA, 1998), sendo um dos ambientes mais ricos em diversidade procariótica (WHITMAN et al., 1998).

Dentre os micro-organismos marinhos, a família *Vibrionaceae* conta com oito gêneros: *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Echinimonas*, *Photobacterium* e *Salinivibrio* (NEDASHKOVSKAYA et al., 2013; THOMPSON et al., 2006, 2007), com características morfológicas e fisiológicas distintas (KRIEG; HOLT, 1984).

O gênero *Vibrio* compreende 118 espécies (TALL et al., 2013), que pertencem ao grupo das Gamaproteobactérias, são Gram-negativos, usualmente móveis, mesofílicos, quimiorganotróficos e fermentadores facultativos (FUHRMAN; HAGSTRÖM, 2008). Os vibrios podem ter diferentes nichos ecológicos, mas em geral são típicos de ambientes estuarinos e/ou marinhos, permanecendo tanto no sedimento como na coluna d'água, sendo comumente isolados de peixes e crustáceos, ou associados com plantas, vivendo como simbiontes ou patógenos (DUMONTET et al., 2000). A maioria das espécies do gênero *Vibrio* necessita de NaCl (2-3%) para crescer e suas concentrações aumentam durante as estações quentes do ano (COLWELL et al., 1977, 2006; URAKAWA; RIVERA, 2006).

Os vibrios são capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (RAMAIAH et al., 2000) e as espécies *Vibrio furnissi* (KEYANI; ROSEMAN, 1999), *V. harveyi* (SVITIL et al., 1997), *V. parahaemolyticus* (HIRONO et al., 1998), *V. proteolyticus* (ITOI et al., 2007), *V. alginolyticus* (SUGINTA, 2007) e *V. cholerae* (MEIBOM et al., 2004), por produzirem a enzima quitinase, têm um papel importante na reciclagem de quitina no ambiente aquático, degradando a carapaça de copépodes, cujo exoesqueleto é revestido de quitina (HUQ; COLWELL, 1994).

Além disso, a sobrevivência e persistência dos vibrios no ambiente aquático tornam-se favorecidas por possuírem a capacidade de ativar, em resposta a estresses ambientais, um estado de dormência denominado "viável, mas não cultivável" (VBNC) (COLWELL, 1996). As células que entram no estado de VBNC não são capazes de formar colônias em meio de cultura convencional, apresentam redução do tamanho e no transporte de nutrientes, entretanto, a biossíntese continua e retomam o crescimento em condições ambientais favoráveis (COLWELL, 2000).

Algumas espécies são patogênicas para organismos marinhos, como camarões (JIRAVANISHPAISAL et al., 1994), peixes (SAEED, 1995), ostras e lagostas (DIGGLES et al., 2000), representadas principalmente por *Vibrio alginolyticus, V. campbellii, V. cholerae, V. fluvialis, V. furnissii, V. harveyi, V. parahaemolyticus,* e *V. vulnificus*, e 12 espécies podem causar doenças em humanos, incluindo infecção em feridas, septicemia, gastroenterite (AUSTIN 2010; DALSGAARD, 1998; PAILLARD et al. 2004; THOMPSON et al. 2004a). E, embora a diversidade e a patogenicidade estejam sendo descritas para diversas espécies de *Vibrio* spp., os problemas de saúde pública são devidos, geralmente, às espécies *V. cholerae, V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (FAO, 2005).

2.1.1 Vibrio cholerae

Vibrio cholerae é uma espécie composta por bacilos móveis por meio de flagelo polar, não formadores de esporos, de metabolismo oxidativo e fermentativo (FARUQUE, 1998; MEKALANOS, 1985). Tais bacilos são classificados em sorogrupos, de acordo com as diferenças na composição da parede celular, especificamente no antígeno somático O. Embora existam 206 sorogrupos, somente os sorogrupos O1 e O139 são responsáveis por epidemias de cólera (LI, 2003; RIVERA et al, 2001), sendo que os demais sorogrupos estão raramente associados com casos esporádicos de gastroenterite (FAO, 2005) e são frequentemente isolados do ecossistema aquático (HOFER; RODRIGUES, 1986; OCTAVIA, et al., 2013; RIVERA et al., 2008).

A doença diarreica cólera, consequência da infecção por *V. cholerae* patogênico, envolve a participação dos genes associados à virulência. A toxina colérica (CT), responsável pela indução da diarreia, é uma proteína formada por uma subunidade A e cinco subunidades B, que são codificadas pelos genes *ctxA* e *ctxB* (MEKALANOS, 1985; SHI et al., 1998). O *pilus* TCP é necessário para a ligação da bactéria à mucosa do intestino humano (KAUFMAN; TAYLOR, 1994; TAYLOR et al., 1987), além de promover a agregação de bactérias, para colonizar de forma mais eficaz o epitélio intestinal (KIRN et al., 2000). Todos os genes relacionados à biogênese do *pilus* TCP residem em

uma ilha de patogenicidade, correspondendo ao genoma de um fago filamentoso, designado VPI, que pode ser adquirido pelo *V. cholerae* via transferência horizontal de genes, no ambiente aquático (DAVIS; WALDOR, 2003). Além disso, algumas linhagens de *V. cholerae* não aglutinável (NAG) são capazes de causar uma gastroenterite similar à cólera, sendo a enterotoxina termo-estável ST o fator de virulência detectado quase que exclusivamente no grupo não-O1 (ARITA et al., 1986; OGAWA et al., 1990; PAL et al., 1992; VICENTE et al., 1997).

2.1.2 Vibrio parahaemolyticus

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria comum do ambiente estuarino incluindo água, sedimentos, partículas suspensas, plâncton, peixes e moluscos, porém raramente encontrada em água doce. Possui o formato de bastonete curvo, móvel por meio de flagelo polar, sendo um anaeróbio facultativo e não esporulante (SAKAZAKI et al., 1968).

Esta bactéria está associada com surtos epidêmicos após o consumo de pescados e moluscos *in natura*, cujos sintomas incluem dores abdominais, diarreia, náuseas, com menos frequência, dores de cabeça e febre, e, em raras ocasiões, a infecção pode resultar em septicemia (FAO, 2003). A patogenicidade de *V. parahaemolyticus* está relacionada com a produção de enzimas hemolíticas citotóxicas, a hemolisina termoestável direta (TDH) e a hemolisina termoestável relativa (TRH), codificadas pelos genes *tdh* e *trh*, respectivamente (LOZANO-LEÓN et al., 2003).

A detecção da produção de TDH entre cepas patogênicas e não-patogênicas ocorre através da reação de beta hemólise nos eritrócitos humanos em teste fenotípico designado teste de Kanagawa (GONZALEZ et al., 2005; HONDA et al., 1987; RODRIGUES, 2009). O fenômeno Kanagawa é produzido por 95% dos isolados clínicos, enquanto menos de 2% dos isolados ambientais os produzem (RISTORI et al., 2007). Magalhães e colaboradores (1991) observaram a produção de uma hemolisina diferente da TDH em cepas Kanagawa negativas causadoras de doenças, e essa hemolisina foi denominada de hemolisina termoestável relativa (TRH).

2.1.3 Vibrio vulnificus

Vibrio vulnificus é uma bactéria móvel, em formato de bacilo encurvado com um único flagelo polar. Distingue-se dos outros membros do gênero por sua capacidade de fermentar a lactose.

Pode ser encontrada na forma isolada ou em associação com sedimentos, areia, peixe, bivalves ou zooplâncton (DEPAOLA et al, 1994; OLIVER et al, 1983).

Esta bactéria pode causar septicemia primária, infecções e gastroenterites em humanos através da exposição de feridas em água ou pelo consumo de frutos do mar crus ou mal cozidos (STROM; PARANJPYE, 2000). Depois da infecção, as células bacterianas se fixam nas células epiteliais intestinais através do pili, e então produzem uma hemolisina que acelera a invasão do patógeno pela corrente sanguínea. Muitos estudos já foram realizados a fim de caracterizar os mecanismos utilizados pelo *V. vulnificus* para causar septicemias fulminantes e infectar feridas. Os fatores associados à virulência relatados incluem uma cápsula polissacarídica (CPS), uma citolisina, uma protease/elastase e uma fosfolipase, que podem ser encontradas em quase todas as estirpes clínicas e ambientais (FAO, 2005; GULIG et al., 2005; SIMPSON et al., 1987; YOSHIDA et al., 1985).

2.1.4 Outras espécies do gênero Vibrio

Vibrio fluvialis é um bacilo encontrado em ambientes marinhos e estuarinos, tanto no sedimento como na coluna d'água, capaz de causar infecções como gastrenterite e diarreia, por meio do consumo de frutos do mar crus ou mal cozidos (FARMER III; JANDA, 2005). No entanto, casos extraintestinais já foram descritos, como sepse, quando a bactéria invade a circulação sanguínea graças à diarreia persistente, causando febre, hipotensão e vômitos (TACKET et al.,1982); feridas cutâneas, que entram em contato com a água ou animais contaminados (FARMER III; JANDA, 2005); e, em casos mais raros, encefalite (HUANG; HSU, 2005) e otite severa (RODRIGUEZ et al., 2005).

Vibrio alginolyticus é uma espécie halofílica, ubiquitária no ambiente marinho, e tem sido reportada como um micro-organismo oportunista, causador de infecções extraintestinais como otites e conjuntivites (CHIEN et al., 2002; PEREIRA, 2007), está associada a doenças em animais marinhos, causando escurecimento e ulcerações nos tecidos de peixes e camarões (BALEBONA et al., 1998) e por causar branqueamento e morte de corais (KUSHMARO et al., 1996).

Vibrio harveyi é uma bactéria luminescente, distribuída em ambientes aquáticos, que tem sido associada a doenças em diversos organismos, provocando lesões em tecidos de peixes e ostras (SHIVU; RAJEEVA et al., 2007) e conhecida por ser o agente patogênico responsável pelas mais

altas taxas de mortalidade na indústria do camarão cultivado no mundo inteiro (AUSTIN et al., 2003; LIU et al., 1996).

2.2 Antibióticos e resistência bacteriana

De acordo com o seu mecanismo de ação, os antibióticos são classificados em bacteriostáticos, quando inibem o crescimento e a reprodução bacteriana, ou bactericidas, quando induzem alterações incompatíveis com a sobrevida bacteriana (TAVARES, 1996). O efeito bactericida pode decorrer de vários mecanismos, que envolvem essencialmente alterações na síntese de parede celular e proteica, na replicação do DNA, no metabolismo do ácido fólico e na permeabilidade da membrana externa das bactérias (PAGES, 2004).

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ocorrer por meio de modificações na estrutura dos sítios onde os antibióticos se ligam, fazendo com que estes não possam exercer sua atividade ou um aumento da disponibilidade destes sítios dentro da bactéria, tornando as doses usuais de antibiótico insuficientes para que se ligue a todos estes locais disponíveis; diminuição da concentração do antibiótico no interior da bactéria, seja pela capacidade de bombear para o meio externo o agente antibacteriano ou pela dificuldade do antibiótico em penetrar no interior do micro-organismo e, pela habilidade em inativar os antibióticos por meio de hidrólise ou por modificação de sua estrutura química (CEFAR, 2006; MARTÍNEZ, 2008; TAVARES, 1996).

Os antibióticos têm desempenhado um importante papel no combate a doenças humanas e de animais aquáticos cultivados (CHYTHANYA et al., 1999; COSTA et al., 2008). A resistência aos antibióticos pode ser produzida por características inerentes às células, sendo geralmente determinada por genes cromossômicos. Por outro lado, algumas estirpes podem sofrer mutações, receber plasmídeos ou transposons e, desse modo, adquirir uma resistência que caracterizará a linhagens delas originadas (BARBOSA; TORRES, 1998).

O fenômeno de resistência microbiana a antibióticos foi acelerado, principalmente, pelo seu uso indiscriminado (BRUNDTLAND, 2000) e, em consequência, observa-se o aumento no número de cepas com múltipla resistência a agentes antimicrobianos, os quais podem ser transportados para ambientes aquáticos, caracterizando um problema de saúde pública (FAO/WHO, 2006). Cada vez mais bactérias patogênicas têm apresentado resistência a um ou diversos antibióticos (LEVY, 2001). Estudos realizados com *Vibrio* têm demonstrado resistência múltipla aos antibióticos, principalmente em isolados clínicos de *V. cholerae* na África e na Índia (MANDOMANDO et al., 2007; OKEKE et

al., 2007; ROYCHOUWDHURY et al., 2008) e em isolados provenientes de água e frutos do mar (AL-OTHRUBI et al., 2014; FERRINI et al., 2008; ROQUE et al., 2001; SAHILAH et al., 2014).

2.3 Identificação de *Vibrio*

Com relação à taxonomia dos vibrios, até os anos 1990, ela foi baseada principalmente em características morfológicas e no comportamento bioquímico e fisiológico das bactérias (TALL et al., 2013). Tradicionalmente, o isolamento e a identificação do gênero *Vibrio*, envolve um pré-enriquecimento, semeadura em meio seletivo, seguido de caracterização bioquímica e sorológica. O isolamento realizado em meio seletivo como o ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) é comumente utilizado, havendo a formação de colônias verdes ou amarelas (devido à fermentação da sacarose) ou com o CHROMagar Vibrio, que permite a diferenciação de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, através da coloração das colônias, sendo elas azul turquesa, malva, e incolor respectivamente (PROBAC). Para a triagem rápida de vibrios, o *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) (FDA, 1995) recomenda o uso de seis provas bioquímicas, entretanto existem *kits* comerciais de identificação bioquímica que utilizam um maior número de provas, como o API 20E.

As metodologias baseadas em biologia molecular, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), têm facilitado à identificação rápida de espécies de *Vibrio*, sorogrupos O1 e O139 de *V. cholerae* e a detecção de genes associados à virulência (CHUN et al., 2001; FIELDS et al.,1992; LIPP et al., 2003; MARKMAN, 2008; RIVERA et al., 2003; SOUZA, 2007). Já, a identificação do gênero pode ser realizada através de sequências gênicas do 16S rRNA, um gene universal, conservado estrutural e funcionalmente, para o qual se dispõe de uma extensa base de dados, podendo ser aplicado a organismos não cultiváveis e que foi proposto como marcador filogenético molecular por Carl Woese no início da década de 1970 (GEVERS, et al., 2005; OLIVEIRA, 2010; OLSEN; WOESE, 1993; ROHWER, et al., 2002). A maioria das técnicas moleculares aplicadas a estudos microbianos baseia-se nas diferenças de composição dos genes ribossomais. Em bactérias, o gene 16S ribossomal é o mais utilizado, sendo considerado uma das mais importantes moléculas para o estudo de filogenia e ecologia microbianas (LOUWS et al., 1999).

A metodologia MLSA (Análise de Sequências Multilocus), consiste no sequenciamento e análise de fragmentos de 3 a 7 genes, essenciais para o metabolismo celular (genes *housekeeping*) (MAIDEN et al., 1998), e que conjuntamente oferecerão informações capazes de distinguir espécies

bacterianas intimamente relacionadas (ZEIGLER, 2003). Resultados obtidos com MLSA estão disponíveis em uma base de dados de acesso público (PubMLST), atualizada constantemente através de recursos computacionais, evitando-se, desta forma, erros ou falta de informações sobre as linhagens (THOMPSON; OLIVEIRA, 2006). Esta metodologia tem sido aplicada em estudos com *Borrelia* (RICHTER et al., 2006), *Ensifer* (MARTENS et al., 2007), *Pseudomonas* (YOUNG; PARK, 2007), micobactérias (MIGNARD; FLANDROIS, 2008), *Bradyrhizobium* (MENNA et al., 2009), *Paenibacillus* (HOSHINO et al., 2009), *Streptomyces* (RONG et al., 2009), *Aeromonas* (MARTÍNEZ-MURCIA et al., 2011) e *Vibrionaceae* (GOARANT et al., 2006; RAMESHKUMAR et al., 2008; THOMPSON et al., 2008; URBANCZYK et al., 2007), ampliando a descrição de novas espécies, principalmente de isolados de origem ambiental, tais como, *Vibrio artabrorum*, *V. atlanticus* (DIEGUEZ et al., 2011), *V. caribbeanicus* (HOFFMANN et al., 2011b), *V. stylophorae* (SHEU et al., 2011), *V. alfacsensis* (GOMEZ-GIL et al., 2012), *V. xiamenensis* (GAO et al., 2012) e *V. zhanjiangensis* (JIN et al., 2012).

Sabe-se que a família *Vibrionaceae* apresenta pares de espécies altamente relacionadas, como por exemplo, *V. cholerae* - *V. mimicus* e *V. fluvialis* - *V. furnissii*, além dos membros do "*Vibrio core group"*, formado por seis espécies (*V. harveyi, V. campbellii, V. rotiferianus, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus* e *V. natriegens)*, que apresentam similaridade de 70% por hibridização DNA-DNA (THOMPSON et al., 2005) e de ≥ 97,6% pelo gene 16S rRNA (CANO-GOMEZ et al., 2011; DORSCH et al., 1992; URAKAWA et al., 1997).

Considerando o alto nível de similaridade do gene 16S rRNA entre as espécies do gênero *Vibrio*, outros genes têm sido propostos como marcadores para a diferenciação e, principalmente, para a descrição de novas espécies. Chakraborty et al. (2006) desenvolveram um método de identificação baseado no gene *toxR*, Thompson et al. (2004a) no gene *recA*, Nhung et al. (2007) no gene *dnaJ*, e Kwok et al. (2002) desenharam iniciadores tendo como alvo o gene *hsp60*.

A análise de genes constitutivos (genes *housekeeping*), como o *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *rpoD*, tornou-se uma alternativa extremamente viável para estudos de taxonomia e filogenia bacteriana (GEVERS et al., 2005; PASCUAL et al., 2010; THOMPSON et al., 2007). O gene *pyrH* codifica a uridilato quinase, enzima essencial ao metabolismo de nucleotídeos e que pode estar envolvida com a divisão celular (LANDAIS et al., 2009); o gene *recA* é necessário para o sistema de reparo do material genético bacteriano; o gene *rpoA* codifica a subunidade alfa da RNA polimerase (responsável pela transcrição gênica e utilizado para a identificação do gênero *Vibrio)* (DALMASSO et al., 2009); o gene *rpoD* o fator sigma 70 da RNA polimerase, responsável pela transcrição celular e

tem sido empregado em estudos dos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Aeromonas* (SOLER et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2000).

Entretanto, um único gene que diferencie perfeitamente todas as espécies ainda não foi identificado, uma vez que nenhum gene é completamente resistente à transferência horizontal, ou às mutações (THOMPSON et al., 2004b). Diante disso, Thompson e colaboradores (2004b), com base na sequência concatenada dos genes de 16S rRNA, *recA* e *rpoA*, sugeriram que a família *Vibrionaceae* fosse dividida em quatro famílias: *Vibrionaceae* (apenas com o gênero *Vibrio)*, *Enterovibrionaceae* (compreendendo os gêneros *Enterovibrio* e *Grimontia*), *Photobacteriaceae* (gênero *Photobacterium*) e *Salinivibrionaceae* (gênero *Salinivibrio*), de forma a facilitar estudos futuros de vibrios. Já, Urbanczyk et al., (2007) sequenciaram 5 genes (*recA*, *rpoA*, *pyrH*, 16S rRNA e *gyrB*) e através da sequência concatenada, sugeriram a criação do gênero *Aliivibrio* para "acomodar" *V. fischeri* e espécies relacionadas. Ademais, a combinação de vários *loci* trará a identificação mais robusta, além de oferecer uma alternativa prática para a hibridização DNA-DNA e 16S rRNA aplicados na taxonomia corrente de vibrios (THOMPSON et al., 2006).

2.4 Ambiente costeiro

A zona costeira brasileira se estende da foz do rio Oiapoque (04º52'45''N) à foz do rio Chuí (33º45'10"S), ocupando aproximadamente três milhões de km^2, sob jurisdição brasileira. Constitui uma região de transição ecológica, desempenhando importante papel no desenvolvimento e reprodução de várias espécies e nas trocas genéticas que ocorrem entre os ecossistemas terrestres e marinhos (MMA, 2008).

Além disso, registra expressiva sobreposição territorial com os biomas Amazônia e Mata Atlântica, bem como, em menor escala, com a Caatinga, Cerrado e Pampa, o que a caracteriza não como uma unidade ecológica, mas como um complexo de ecossistemas contíguos formadores de ambientes de alta complexidade ecológica e de extrema relevância para a sustentação da vida no mar (MMA, 2008). Representa, portanto, uma região extremamente promissora e pouco explorada, tanto em diversidade genética como metabólica, constituindo assim uma inestimável fonte para o descobrimento de novos micro-organismos importantes para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável (COLWELL, 1997; RIVERA et al., 2008).

Os ambientes marinhos e costeiros propiciam oportunidades para atividades econômicas, responsáveis por cerca de 70% do PIB nacional, tais como, a pesca, agricultura, atividade portuária,

petrolífera, aquicultura, carcinicultura. Entretanto, tais atividades, associadas ao crescimento populacional desordenado, ocasionaram mudanças ambientais significativas, que podem interferir negativamente na qualidade do ambiente, com consequências diretas na qualidade de vida das populações residentes nestas áreas (MMA, 2008; RIVERA et al., 2007, 2008).

O impacto econômico global da contaminação do ambiente marinho, do consumo de frutos do mar ou seu uso recreacional, em termos de enfermidades humanas, saúde debilitada e perda de qualidade de vida, pode ser de aproximadamente US$ 13 bilhões, uma vez que o litoral brasileiro recebe mais de 3.000 toneladas de poluentes líquidos por dia, constituídos principalmente de efluentes industriais e esgotos domésticos (MMA, 2008). A maioria das doenças emergentes não é ocasionada por novos micro-organismos, mas por agentes já conhecidos, infectando hospedeiros novos ou não-usuais. Um surto é favorecido por mudanças nas condições ambientais, que tanto podem aumentar a prevalência de uma doença existente, quanto favorecer uma nova doença, entretanto é sempre difícil identificar uma causa específica. Duas condições, variabilidade climática e atividade antropogênica crônica, parecem ter envolvimento em epidemias, pela diminuição da resistência do hospedeiro e pelo favorecimento na transmissão de determinados patógenos (HARVELL et al., 1999).

2.4.1 Ambiente costeiro do Estado de São Paulo

No Estado de São Paulo, a Zona Costeira apresenta uma extensão de 700 km e uma área de cerca de 27.000 km², incluindo 36 municípios e abrigando a maior parte da Mata Atlântica existente no Estado (CETESB, 2008). Considera-se ainda que estes ambientes contenham elevado grau de fragilidade ambiental devido às suas características próprias, tais como, propriedades litológicas, hidrográficas, geomorfológicas, climáticas e biogeográficas. Neste contexto, se insere a região litorânea do Estado de São Paulo, na qual a atividade turística, associada à sua susceptibilidade ambiental, gera um alto grau de alteração causada pelas atividades antrópicas, que muitas vezes ultrapassam a capacidade de suporte desse ambiente (SOUZA; CUNHA, 2011). O Canal de São Sebastião, o município de Ubatuba e a Baixada Santista são importantes regiões, tanto do ponto de vista econômico, quanto de diversidade biológica, e apresentam características físicas, químicas e biológicas distintas entre si, merecendo, portanto, ser estudados.

2.4.1.1 Canal de São Sebastião

O Canal de São Sebastião é uma passagem marinha com extensão de 25 Km, localizado no litoral norte do estado de São Paulo, entre o município de São Sebastião e a Ilha de São Sebastião (SILVA, 2001). Trata-se de uma região com atividades pesqueiras, áreas de lazer, abriga o terminal petrolífero Almirante Barroso (TEBAR), o Porto de São Sebastião, e é o local onde desembocam três emissários submarinos de esgotos municipais (MENDES, 2007).

A água do mar do Canal de São Sebastião é caracterizada por apresentar uma mistura em proporções variáveis das Águas Costeiras, que apresenta temperatura oscilando entre 20 e 28 °C e salinidade entre 34,0 e 35,0%, Águas Tropicais com altos valores de temperatura e salinidade (T>20 ºC e S>36,4 %), e pelas águas frias das Águas Centrais do Atlântico Sul, que apresentam temperatura e salinidade relativamente baixas (T<20 ºC e S <36,4 %) (SILVA 2001).

2.4.1.2 Baixada Santista

O complexo estuarino de Santos está localizado na porção central do litoral paulista, englobando as Baías de Santos e São Vicente e delimitado nas suas extremidades pela Serra de Mongaguá e pela Ilha de Santo Amaro (FUKUMOTO, 2003). Possui como fontes de contaminação o Porto de Santos, o Pólo Industrial de Cubatão, lixões e o emissário de Santos, que despeja o esgoto doméstico o qual é responsável pela emissão de alta carga de nutrientes, surfactantes e metais pesados (ABESSA et al., 2005; MARTINS, 2005; MEDEIROS, 2000).

A circulação de água na baía de Santos e áreas adjacentes é bastante complexa, com contribuições de marés e ventos. Pela Plataforma Continental Sudeste do Brasil, abriga as massas de Água Costeira, com os menores valores de salinidade e altos índices de nutrientes, Água Tropical, com alta temperatura e salinidade (T > 20 ºC, S >36 %) e baixas concentrações de nutrientes e Água Central do Atlântico Sul, com baixos índices de temperatura e salinidade e alta concentração de nutrientes (BRAGA; NIENCHESKI, 2006; CASTRO et al., 2006).

2.4.1.3 Ubatuba – Saco da Ribeira

No município de Ubatuba, está localizado o Saco da Ribeira, ladeado pelas praias de Enseada e Lázaro, que apresenta grande concentração de estabelecimentos voltados para o turismo e atividade

náutica e é o local do único posto de abastecimento de combustíveis flutuante do litoral norte (CETESB, 2008).

A região é caracterizada por um regime oligo a mesotrófico, sendo a produtividade primária limitada pela escassez de nutrientes inorgânicos (BRAGA; MULLER, 1998). No verão, a presença da Água Central do Atlântico Sul promove incremento de nutrientes na zona eufótica, ocorrendo *blooms* esporádicos de organismos planctônicos. O aumento da ocorrência de chuvas e tempestades promove 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 (GAETA et al., 1999; MAHIQUES, 1995).

3 OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Caracterizar ao nível molecular as espécies do gênero *Vibrio* isoladas de amostras de água do mar, plâncton e bivalves, coletadas na Baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba, analisar a susceptibilidade destes vibrios aos antibióticos e os genes associados à virulência, além de relacionar os resultados obtidos com as diferenças espaciais e as atividades antropogênicas existentes nos locais estudados.

3.2- Objetivos específicos

- Identificar fenotipicamente os isolados utilizando o Sistema de Identificação Bioquímica API 20E;
- Avaliar a susceptibilidade dos diferentes isolados aos agentes antimicrobianos;
- Identificar os isolados potencialmente patogênicos, pela Reação em Cadeia da Polimerase, com o uso dos seguintes genes associados à virulência: *ctxA, tcpA, stn/sto, tdh, trh*;
- Caracterizar os isolados através da técnica de MLSA;
- Relacionar as espécies de vibrios, susceptibilidade aos antibióticos e genes associados à virulência com o impacto antropogênico existente nas 3 regiões estudadas (Baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo, foram selecionados 132 *Vibrio* spp., isolados de amostras de água do mar, plâncton e bivalves, coletados em três regiões do litoral do Estado de São Paulo. Todos os isolados fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.1 Coleta das amostras

4.1.1 Descrição da área de estudo, período de amostragem e pontos de coleta

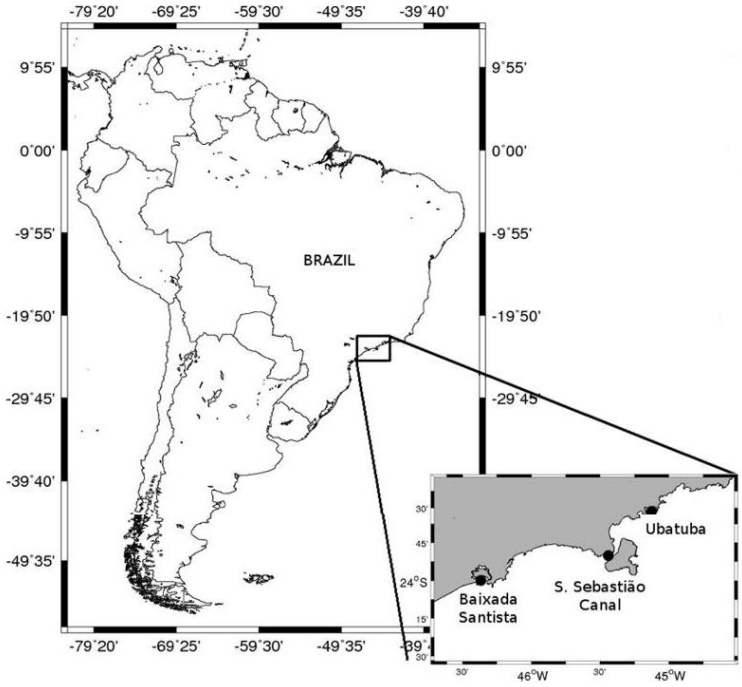
A qualidade microbiológica das amostras de água do mar do Canal de São Sebastião, Ubatuba e Baixada Santista foi verificada por Burbano-Rosero (2011), utilizando indicadores de contaminação fecal com o objetivo de caracterizar os três ambientes quanto ao nível de impacto antropogênico presente em cada região. As amostras de água coletadas do Canal de São Sebastião e de Ubatuba apresentaram contagens de coliformes termotolerantes, *E. coli*, e enterococos intestinais abaixo dos valores estabelecidos na Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 274/2000, e, ao comparar com os dados da CETESB, mostrou que as praias próximas aos pontos de coletas permaneceram próprias para atividades de recreação primária (CETESB, 2008). Já nas amostras de água coletadas na Baixada Santista, os valores encontrados para os indicadores de contaminação fecal ficaram acima dos estabelecidos, além da classificação anual “Ruim” para a balneabilidade pela CETESB. Desta forma, por serem ambientes com diferentes características em relação ao nível de impacto antropogênico, o Canal de São Sebastião, Ubatuba e Baixada Santista foram os locais selecionados para a coleta das amostras.

No Canal de São Sebastião, as amostras foram coletadas mensalmente, no período de outubro de 2005 a janeiro de 2007, em dois pontos: Ponto 1 - localizado em frente à Praia do Segredo (Latitude 23° 49’ 50” S, Longitude 45° 25’ 20” W), Ponto 2 - na região norte da Praia de Baraqueçaba (Latitude 23° 49’ 56” S, Longitude 45° 25’ 51” W) (Figura 1).

Em Ubatuba, as amostras foram coletadas entre os meses de fevereiro a maio de 2006, em dois pontos: Ponto 1 - localizado na Latitude 23° 30' 02" S, Longitude 45° 07’ 07” W, Ponto 2 - na Latitude 23° 30’ 41” S, Longitude 45° 06’ 04” W (Figura 1).

Na Baixada Santista as coletas de amostras foram realizadas entre os meses de fevereiro a junho de 2006 em três pontos de coleta: Ponto 1 - localizado na entrada da cidade de São Vicente (Latitude 23° 59’ 56” S, Longitude 46° 22’ 26” W), Ponto 2 - na Boca da Barra, depois da Ilha das Palmas (Latitude 24° 02’ 25” S, Longitude 46° 19’ 20” W) e Ponto 3 - próximo à Marina Astúrias (Latitude 23° 59’ 50” S, Longitude 46° 17’ 99” W) (Figura 1).

Figura 1- Mapa do Estado de São Paulo com os locais de coleta das amostras: Canal de São Sebastião, Ubatuba e Baixada Santista.



Fonte: Adaptado de BURBANO-ROSERO et al., 2011

4.2 <u>Recuperação e identificação bioquímica</u>

Os isolados foram submetidos à recuperação para verificar sua pureza e viabilidade nos meios de cultura TCBS (OXOID) e CHROMagar Vibrio (PROBAC). A identificação bioquímica foi realizada através do Sistema de Identificação Bioquímica API 20E (Bio-Merieux), de acordo com as instruções do fabricante.

4.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para determinar o perfil de susceptibilidade aos diferentes antibióticos, empregou-se o teste de disco-difusão (BENSON, 1998) seguindo os critérios do "*Clinical Laboratory Standards Institute* - CLSI", para *Vibrio cholerae*, com o meio de cultura Mueller-Hinton contendo 2% de NaCl e o protocolo recomendado para Enterobactérias utilizando: ácido nalidíxico 30 µg (NAL), ampicilina 10 µg (AMP), cefalotina 30 µg (CFL), cefepima 30 µg (CPM), cefotaxima 30 µg (CTX), cefoxitina 30 µg (CFO), ciprofloxacina 5 µg (CIP), cloranfenicol 30 µg (CLO), estreptomicina 10 µg (EST), gentamicina 10 µg (GEN), meropenem 10 µg (MER), tetraciclina 30 µg (TET) e trimetoprima 5 µg (TRI) (CLSI, 2009).

4.4 Caracterização molecular

4.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração e a pureza do DNA obtido foram determinadas através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 mM; EDTA 0,001 M, pH 8,0) e em espectrofotômetro (NanoDrop® ND 1000) (SAMBROOK, et al., 1989).

4.4.2 Caracterização dos genes associados à virulência

Com o uso da reação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos (Quadro 1), foram verificados os principais genes associados à virulência: genes que codificam a toxina colérica (*ctxA*), fator de colonização (*tcpA*) Clássico e El Tor (patogenicidade de *V. cholerae* O1 toxigênico), enterotoxina termoestável de *V. cholerae* não aglutinável – NAG (*stn/sto*), hemolisina termoestável direta (*tdh*) e a hemolisina termoestável relativa (*trh*).

O fragmento amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) com o marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), e os géis corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observados no fotodocumentador *Gel Doc XR* (Bio Rad).

Quadro 1 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para os genes associados à virulência.

Gene	Sequência (5′–3′)	Tamanho do *amplicon* (pb)	Referência
ctxA	94F: CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG 641R: CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC	564	FIELDS et al., 1992
tcpA	72F: CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG 477R: CGAAAGCACCTTCTTTCACGTTG 647R: TTACCAAATGCAACGCCGAATG	Clássico: 620 El Tor: 451	RIVERA et al., 2001
tdh	L-tdh: GTAAAGGTGTCTGACTTTTTGAC R-tdh: TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC	269	NISHIBUCHI; KAPER, 1990
trh	L-trh: TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT R-trh: CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	500	HONDA; IIDA, 1993
stn/sto	stn/sto1: TCGCATTTAGCCAAACAGTAGAAA stn/sto2: GCTGGATTGCAACATATTTCGC	172	RIVERA et al., 2001

4.4.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA e genes housekeeping

4.4.3.1 Amplificação do gene 16S rRNA

Nas reações de PCR, foram utilizados os seguintes reagentes: 5 µL de solução tampão 10X (Invitrogen), 1,5 µL de $MgCl_2$ a 50 mM (Invitrogen), 1,25 µL de solução mix de dNTPs a 10 mM (Invitrogen), 0,75 µL de cada solução dos iniciadores 27F e 1401R (Tabela 3) a 20 µM (Invitrogen), 0,4 µL da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen), 39,35 µL de água ultra pura e 1,0 µL de DNA (50 ng/µL), em um volume final de 50 µL. Como controle positivo, foi incluído o DNA de *E.coli* ATCC 25922 e água ultra pura como controle negativo.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler ep Gradient S – Eppendorf) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguindo-se 30 ciclos de amplificação (94 °C por 1 minuto/ 55 °C por 1 minuto/ 72 °C por 3 minutos) e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

O fragmento de DNA amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), juntamente com os marcadores de peso molecular Lambda DNA/*Hind* III (Promega) e 1 Kb

Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observados no fotodocumentador *Gel Doc XR* (Bio Rad).

4.4.3.2 Purificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

Os produtos das reações de 16S rRNA dos isolados foram purificados com o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Após a purificação, 1,0 µL da reação de PCR purificada, juntamente com os marcadores de peso molecular Lambda DNA/*Hind* III (Promega) e 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen) foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen) 1,0% (p/v), em tampão TAE 1X a 75 V por 90 minutos. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observado no fotodocumentador *Gel Doc XR* (Bio Rad). Posteriormente, o produto de PCR foi enviado ao Centro de Estudos do Genoma Humano – USP para a realização do sequenciamento parcial do gene utilizando os iniciadores 27F, 530F, 782R, 1401R (Quadro 2) no sequenciador *ABI 3730 DNA Analyser*.

4.4.3.3 Amplificação dos genes *housekeeping*: *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD* (MLSA)

Nas reações de PCR dos genes *pyrH, recA, rpoA*, e *rpoD*, utilizando os iniciadores *pyrH*-04-F e *pyrH*-02-R; *recA*-01-F e *recA*-02-R; *rpoA*-01-F e *rpoA*-03-R; *rpoD*-70-F e *rpoD*-70-R respectivamente (Tabela 3), foram utilizados os seguintes reagentes: 5 µL de solução tampão 10X (Invitrogen), 1,5 µL de $MgCl_2$ a 50 mM (Invitrogen), 5,0 µL de solução mix de dNTPs a 2 mM (Invitrogen), 1,25 µL de cada solução dos iniciadores a 20 µM (Invitrogen), 0,5 µL da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen), 34,5 µL de água ultra pura e 1,0 µL de DNA (50 ng/µL), em um volume final de 50 µL.

As condições de amplificação dos genes *pyrH, rpoA*, e *recA*, foram: 95 °C por 5 minutos/ 3 ciclos (95 °C por 1 minuto/ 55 °C por 2 minutos e 15 segundos/ 72 °C por 1 minuto e 15 segundos) / 30 ciclos (95 °C por 35 segundos/ 55 °C por 1 minuto e 15 segundos / 72 °C por 1 minuto e 15 segundos) / 72 °C por 7 minutos, realizadas no termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf). Para o gene *recA* a temperatura de anelamento foi de 46 °C. As condições de

amplificação do gene *rpoD* foram: 94 °C por 5 minutos/ 30 ciclos (94 °C por 1 minuto/ 59 °C por 45 segundos/ 72 °C por 2 minutos)/ 72 °C por 10 minutos, realizadas no termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf). Como controle positivo, foi incluído o DNA de *E. coli* ATCC 25922 e água ultra pura como controle negativo.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), e os géis corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), e, observados no fotodocumentador *Gel Doc XR* (Bio Rad).

4.4.3.4 Purificação e sequenciamento dos genes *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD* (MLSA)

Os produtos de PCR foram purificados conforme descrito no item 3.3.3.2, e submetidos ao sequenciamento dos genes *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD*, utilizando os mesmos iniciadores usados na amplificação de cada gene. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP no sequenciador *ABI 3730 DNA Analyser*.

Quadro 2 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR dos genes16S rRNA, *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD*.

Gene	Iniciador	Sequencia (5′–3′)	Referência
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	LANE, 1991
	530F	CAGCAGCCGCGGTAATAC	CHUN, 1995
	782R	ACCAGGGTATCTAATCCTGT	NUBEL et al., 1996
	1401R	CGGTGTGTACAAGACCC	VOSSBRINCK et al., 1993
pyrH	*pyrH*-04-F	ATGASNACBAAYCCWAAACC	THOMPSON et al., 2008
	pyrH-02-R	GTRAABGCNGMYARRTCCA	THOMPSON et al., 2008
recA	*recA*-01-F	TGARAARCARTTYGGTAAAGG	THOMPSON et al., 2008
	recA-02-R	TCRCCNTTRTAGCTRTACC	THOMPSON et al., 2008
rpoA	*rpoA*-01-F	ATGCAGGGTTCTGTDACAG	THOMPSON et al., 2008
	rpoA-03-R	GHGGCCARTTTTCHARRCGC	THOMPSON et al., 2008
rpoD	*rpoD*-70-F	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGGNACNGT	LE ROUX et al., 2005
	rpoD-70-R	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYT	LE ROUX et al., 2005

4.4.4 Análises dos resultados

4.4.4.1 Análises das sequências obtidas pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e dos genes *housekeeping*

As sequências nucleotídicas obtidas pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *rpoD* tiveram seus cromatogramas analisados e editados no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (7.0.9.0) e *Bionumerics* 5.10. Após a edição, as sequências obtidas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, foram comparadas com as sequências disponibilizadas no RDP (*Ribosomal Database Project* – rdp.cme.msu.edu). As sequências obtidas pelo sequenciamento dos genes *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *rpoD* foram comparadas com as sequências presentes no banco de dados *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI). Árvores filogenéticas foram construídas individualmente para cada gene estudado, com a inserção de sequências de cepas ATCC (*American Type Culture Collection*), utilizando-se o programa *MEGA 5.05* e o método de *Neighbor-joining* com *bootstrap* de 1000 repetições. A similaridade (*Pairwise similarity*) entre os isolados e as sequências referências foi calculada pelo programa *MEGA 5.05.* A cepa *Methanocaldococcus vulcanis* M7; CP001787 foi utilizada como grupo externo na construção de todas as árvores filogenéticas.

5 RESULTADOS

5.1 Reisolamento e identificação bioquímica

Todos os isolados foram reisolados em TCBS e, destes, 69 (52,3%) apresentaram colônia amarela com o centro laranja, 35 (26,5%) colônia de cor verde e 28 (21,2%) colônia de cor amarela. Quando semeados no CHROMagar Vibrio, 79 (59,8%) apresentaram colônia de cor branca, 29 (21,9%) de cor malva, 12 (9,1%) de cor azul e 12 (9,1%) não cresceram neste meio.

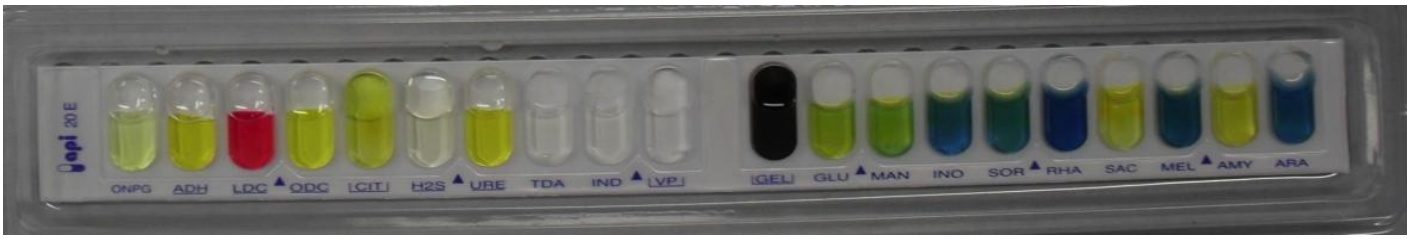
O TCBS é um meio seletivo usado para o isolamento e cultivo de *Vibrio* spp., com colônias características de coloração amarela, verde ou verde-azulada; porém outros micro-organismos marinhos também podem crescer neste meio (THOMPSON, 2004).

O CHROMagar Vibrio (PROBAC; Paris, França) utiliza tecnologia cromogênica para permitir o isolamento e detecção de vibrios resultando em colônias que podem ser diferenciadas pela coloração característica de cada espécie: *V. vulnificus* e *V. cholerae* (verde azulado a azul turquesa), *V. parahaemolyticus* (malva) e *V. alginolyticus* (branca/incolor), fornecendo, assim, uma maior quantidade de informações sobre os isolados a serem estudados.

Dos 132 isolados submetidos ao Sistema de Identificação Bioquímica API 20E, que consiste em 21 testes bioquímicos, foi possível identificar 112 como gênero *Vibrio*, e de acordo ao teste, 5 espécies foram sugeridas (Quadro 3 e Figura 2).

No processo de identificação dos testes bioquímicos, usando Sistema de Identificação Bioquímica API 20E, o resultado pode ser determinado e catalogado em onze Perfis de Identificação: Excelente Identificação (EI), Muito Boa Identificação (MBI), Boa Identificação (BI), Boa Identificação do Gênero (BIG), Identificação Aceitável (IA), Identificação Aceitável do Gênero (IAG), Identificação Presuntiva (IP), Fraca Discriminação (FD), Perfil Duvidoso (PD), Perfil Inaceitável (PI) e Galeria não Identificável (GNI). De acordo com esses critérios, decidiu-se agrupar em quatro perfis para avaliar a resposta de acordo aos 21 substratos utilizados. Assim, 50,7% dos isolados apresentaram o perfil “fraca discriminação” ou o “perfil duvidoso”, sendo necessários testes moleculares para a identificação da espécie de uma forma mais acurada (Quadro 4).

Figura 2- Comportamento bioquímico do isolado PF601, identificado como *V. fluvialis* (Boa Identificação) usando o Sistema de Identificação Bioquímica API 20E



Quadro 3 – Espécies sugeridas de *Vibrio* spp. utilizando o Sistema de Identificação Bioquímica API 20E

Nível		Número de isolados (n)	
Gênero:	*Vibrio*	112	84,8%
Espécie:	*V.fluvialis*	49	37,2%
	V.alginolyticus	46	34,8%
	V.parahaemolyticus	9	6,8%
	V.vulnificus	6	4,5%
	V.mimicus	2	1,5%
	Outras	20	15,2%
Total		**132**	**100%**

Quadro 4- Perfil do Sistema de Identificação Bioquímica API 20E dos isolados de *Vibrio* spp. por amostra e local de coleta

Local	Amostra	Número de isolados		Perfil 1	Perfil 2	Perfil 3	Perfil 4
Ubatuba	Água do mar	7	17		1	3	3
	Bivalve	5				3	2
	Plâncton	5				4	1
Baixada Santista	Água do mar	28	37			17	11
	Bivalve	3				3	
	Plâncton	6				2	4
Canal de São Sebastião	Água do mar	30	78	4	5	7	14
	Bivalve	20				10	9
	Plâncton	28				18	11
Total		**132**		**4 (3,0%)**	**6 (4,5%)**	**67 (50,7%)**	**55 (41,6%)**

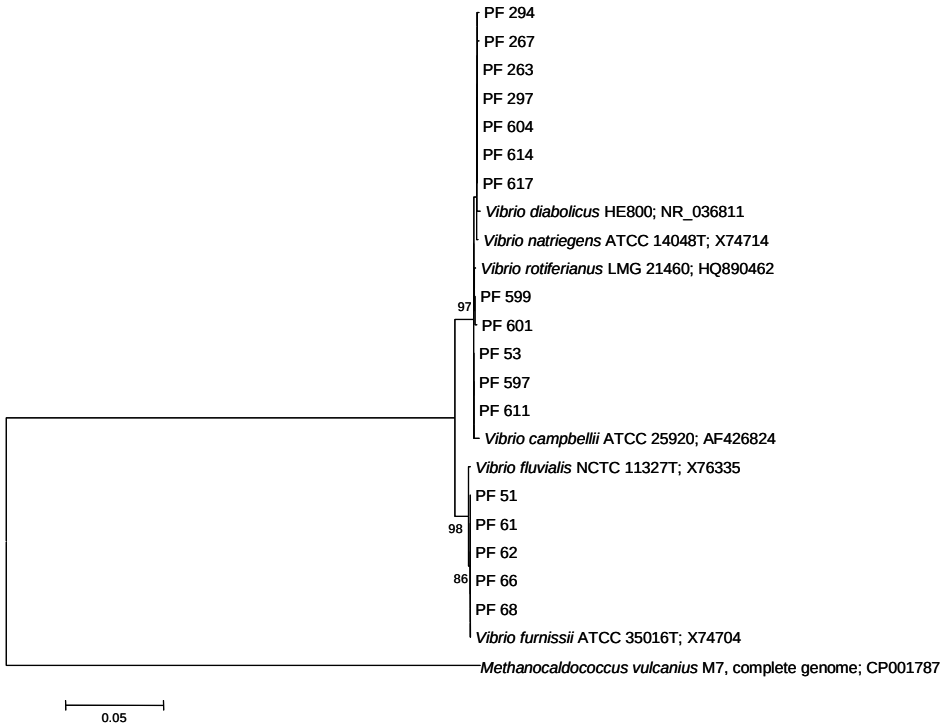
Legenda: Perfil 1- EI (Excelente Identificação) ou MBI (Muito Boa Identificação); Perfil 2- BI (Boa Identificação) ou IA (Identificação Aceitável); Perfil 3- FD (Fraca Discriminação) ou PD (Perfil Duvidoso); Perfil 4- PI (Perfil Inaceitável).

5.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA: determinação do gênero *Vibrio*

Para a confirmação do gênero *Vibrio*, os 132 isolados foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (aproximadamente 1200 nucleotídeos), e as sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponibilizadas no RDP (*Ribossomal Database Project*).

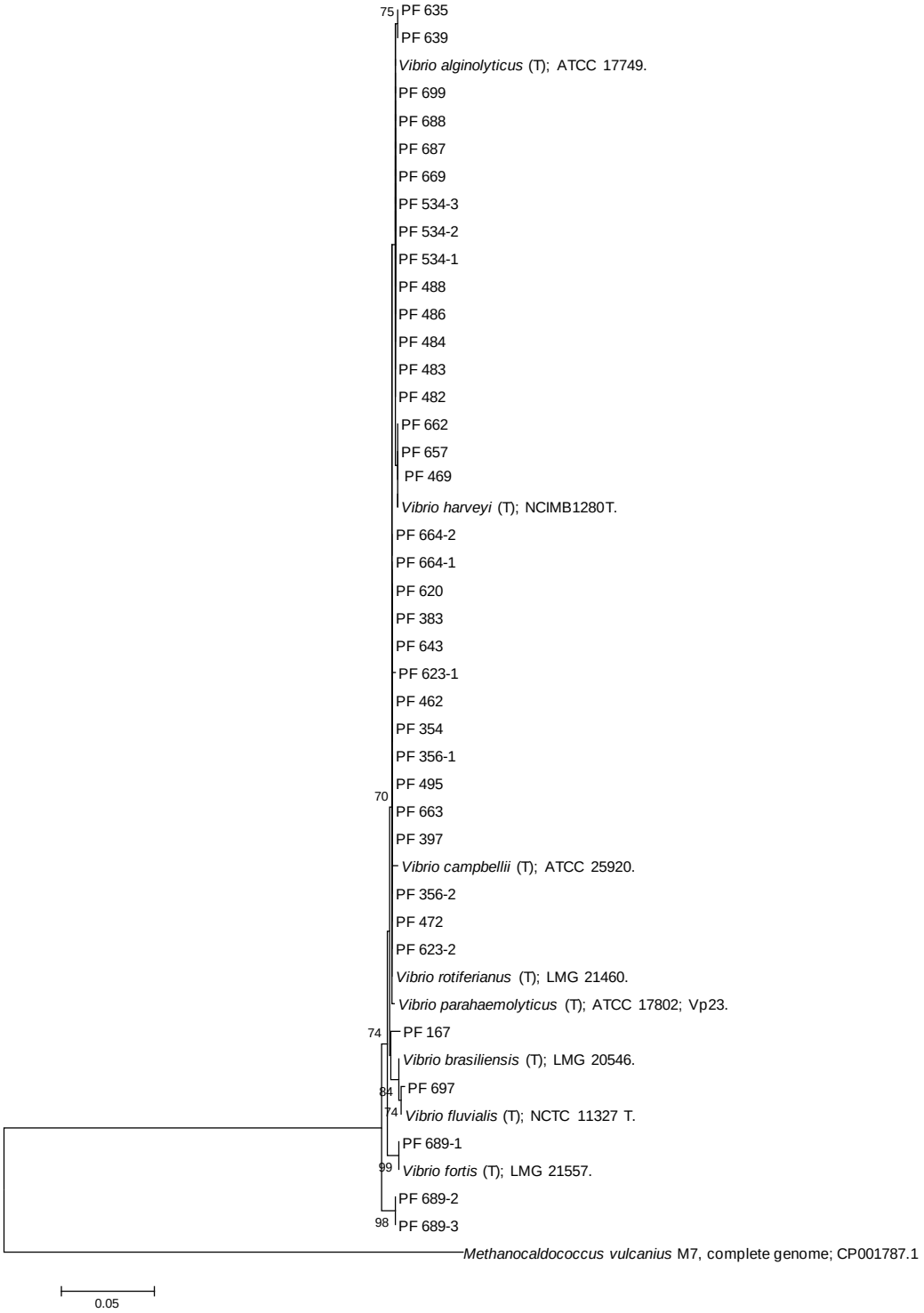
As sequências obtidas pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos 78 isolados do Canal de São Sebastião, 37 isolados da Baixada Santista e 17 isolados de Ubatuba foram comparadas com as sequências disponibilizadas no RDP (*Ribossomal Database Project*) e foram classificados como sendo do gênero *Vibrio* (Figuras 3, 4 e 5).

Figura 3- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA de *Vibrio* spp. isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no RDP.



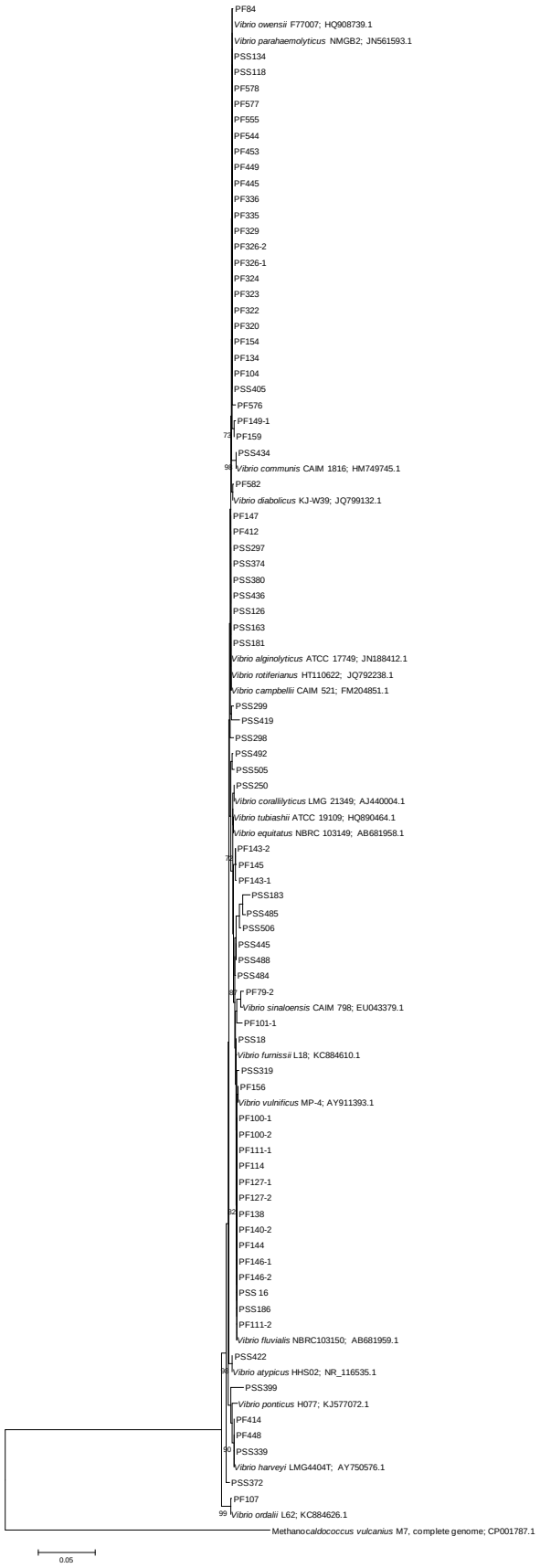
Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

Figura 4- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA de *Vibrio* spp. isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no RDP.



Nota: Valore de bootstrap <70 foram removidos da figura.

Figura 5- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA de *Vibrio* spp. isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no RDP.



Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

5.3 Análise de susceptibilidade aos antimicrobianos

5.3.1 Padronização da metodologia para a determinação da concentração do inóculo e do meio de cultura apropriado para vibrios

Antes de iniciar os experimentos, decidiu-se realizar testes preliminares para a determinação do meio apropriado para o antibiograma, da concentração do inóculo a ser utilizado, e da temperatura de incubação, baseando-se em duas considerações:

1- Durante a coleta de amostras, entre 2005 e 2007, foram observados diversos valores de salinidade nas regiões costeiras estudadas: no Canal de São Sebastião variou de 34 a 35‰, na Baixada Santista, de 15,5 a 31,8‰ e, em Ubatuba, de 26,4 a 31,7‰ (BURBANO-ROSERO et al., 2011), e a temperatura das amostras de água do mar "*in situ*" variando de 15,2 °C até 31,9 ° C.

2- Trabalhos realizados por Ottaviani e colaboradores (2001) mostraram que o teste de disco-difusão, utilizando-se ágar Mueller-Hinton com concentrações variando de 1 a 4% de NaCl, proporcionou melhores resultados, sem mostrar diferenças na susceptibilidade aos antibióticos.

O teste piloto foi realizado utilizando o meio Mueller-Hinton contendo concentrações de cloreto de sódio (NaCl) de 2, 3 e 4%, a duas temperaturas: 28 °C e 35 °C, e um inóculo da cultura bacteriana superior ao recomendado (absorbância de 0,08 a 0,13), devido ao não crescimento dessas culturas durante os ensaios iniciais seguindo o protocolo padrão do CLSI.

Para a definição dos parâmetros testados, foram avaliados 64 isolados, que permitiram a escolha do meio de cultura Mueller-Hinton contendo 2% de NaCl, a temperatura para o crescimento de 28 °C, e a suspensão bacteriana com a absorbância de 1,0 [medida em aparelho espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific)].

5.3.2 Teste de disco-difusão

Após a padronização do teste de susceptibilidade aos antibióticos em vibrios, definiu-se o uso de ágar Mueller-Hinton com 2% de NaCl, partindo-se de uma suspensão bacteriana com uma absorbância de 1,0. Os resultados da resistência aos treze antibióticos empregados estão apresentados de acordo à origem dos isolados e tipo de amostra (Quadro 5).

Na Baixada Santista, os 37 *Vibrio* spp. foram 100% sensíveis à cefotaxima, ao meropenem, à tetraciclina e ao cloranfenicol, 97,3% ao ácido nalidíxico, à ciprofloxaxina, à cefepima e à trimetoprima. Dois (5,4%) isolados (PF397 e PF697) foram sensíveis a todos os antibióticos testados.

Foi observada a resistência a nove dos 13 antibióticos testados (Quadro 6): ampicilina (64,9%), cefalotina (35,1%), estreptomicina (21,6%), cefoxitina (16,2%), gentamicina (10,8%), ao ácido nalidíxico, cefepima, ciprofloxaxina e trimetoprima (2,7%). Dezoito (48,6%) isolados foram resistentes a dois ou mais antibióticos (Quadro 9).

Os dezessete isolados de Ubatuba foram 100% sensíveis à cefepima, ao meropenem, ao ácido nalidíxico, à ciprofloxaxina, à estreptomicina, à gentamicina, à tetraciclina, ao cloranfenicol, e à trimetoprima. Foi observada a resistência a 4 antibióticos (Quadro 7): ampicilina (82,3%), cefalotina (76,4%), cefoxitina (17,6%) e cefotaxima (5,8%), e onze (64,7%) isolados apresentaram multirresistência (Quadro 9).

Dos isolados do Canal de São Sebastião, foram submetidos ao teste 78 isolados, sendo 100% sensíveis ao ácido nalidíxico, à ciprofloxaxina e ao meropenem, 98,7% à tetraciclina, 96,2% ao cloranfenicol e à cefotaxima, 94,9% à estreptomicina, à gentamicina e à trimetoprima. Nove (11,4%) isolados (PF100-1, PF138, PF140-2, PF448, PF555, PSS18, PSS181, PSS434 e PSS492) foram sensíveis a todos os antibióticos testados. Observou-se a resistência a 10 antibióticos dos 13 testados (Quadro 8): ampicilina (58,2%), cefalotina (55,7%), cefoxitina (6,3%), cefepima, estreptomicina, gentamicina e trimetoprima (5%), cefotaxima e cloranfenicol (3,8%), tetraciclina (1,3%). Os isolados foram agrupados em perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos (Quadro 9), sendo possível verificar que 34 (43,6%.) foram resistentes a dois ou mais antibióticos.

Quadro 5- Resistência aos antibióticos de *Vibrio* spp. por amostra e local de coleta

			Antibióticos												
Local	**Amostra**	**Número de isolados**	**AMP**	**CFO**	**CTX**	**CPM**	**MER**	**CFL**	**NAL**	**CIP**	**EST**	**GEN**	**TET**	**CLO**	**TRI**
			R	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**
Ubatuba	Água do mar	7	7					5							
	Bivalve	5	5	2	1			4							
	Plâncton	5	2	1				4							
Baixada Santista	Água do mar	28	17	5		1		9	1	1	7	3			1
	Bivalve	3	3					1							
	Plâncton	6	4	1				3			1	1			
Canal de São Sebastião	Água do mar	30	15	2		2		14			3			3	2
	Bivalve	20	14		1	1		12			1	1	1		
	Plâncton	28	15	3	2	1		17				3			2
Total		**132**	**82**	**14**	**4**	**5**	**0**	**69**	**1**	**1**	**12**	**8**	**1**	**3**	**5**

Legenda: AMP: ampicilina, CFO: cefoxitina, CTX: cefotaxima, CPM: cefepima, MER: meropenem, CFL: cefalotina, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxaxina, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, CLO: cloranfenicol e TRI: trimetoprima. R: resistentes.

Quadro 6: Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de vibrios da Baixada Santista

Isolados	Ampicilina	Cefoxitina	Cefotaxima	Cefepima	Meropenem	Cefalotina	Ácido Nalidíxico	Ciprofloxaxina	Estreptomicina	Gentamicina	Tetraciclina	Cloranfenicol	Trimetroprima
PF 167	S	S	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
PF 354	R	I	I	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S
PF 356 (1)	R	S	I	S	S	I	R	R	I	S	S	S	I
PF 356 (2)	R	S	I	S	S	I	S	I	I	S	S	S	I
PF 383	S	S	I	R	S	S	S	I	I	I	S	S	S
PF 397	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PF 462	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PF 469	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
PF 472	R	I	I	I	S	R	S	I	R	I	S	S	I
PF 482	R	R	I	S	S	I	S	I	I	S	S	S	S
PF 483	I	R	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S
PF 484	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I
PF 486	R	R	I	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S
PF 488	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
PF 495	R	I	S	S	S	R	S	S	I	I	I	S	I
PF 534 (1)	R	I	I	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S
PF 534 (2)	R	I	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S
PF 534 (3)	R	I	I	S	S	R	S	I	I	S	I	S	S
PF 620	R	I	S	S	S	I	S	S	I	S	I	S	I
PF 623 (1)	R	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	I
PF 623 (2)	R	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	I
PF 635	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
PF 639	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
PF 643	R	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	I
PF 657	R	S	S	S	S	R	S	I	R	S	S	S	I
PF 662	R	R	S	I	S	I	S	S	I	S	S	S	S
PF 663	R	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	I
PF 664 (1)	R	S	I	I	S	I	S	S	I	S	S	S	S
PF 664 (2)	R	I	I	S	I	R	S	S	I	I	S	S	S
PF 669	R	I	I	I	S	R	S	I	I	R	S	S	I
PF 687	I	R	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I
PF 688	R	S	S	S	I	I	S	I	R	R	S	S	I
PF 689 (1)	S	I	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
PF 689 (2)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
PF 689 (3)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
PF 697	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PF 699	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: S – susceptível; I – intermediário; R – resistente

Quadro 7: Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de vibrios de Ubatuba

ISOLADOS	Ampicilina	Cefoxitina	Cefotaxima	Cefepima	Meropenem	Cefalotina	Ácido Nalidíxico	Ciprofloxaxina	Estreptomicina	Gentamicina	Tetraciclina	Cloranfenicol	Trimetroprima
PF 51	R	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PF 53	R	I	I	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PF 61	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
PF 62	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PF 66	R	I	I	S	S	R	S	S	I	S	I	S	S
PF 68	I	I	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PF 263	I	I	S	I	S	I	S	I	I	I	S	S	I
PF 267	R	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	I
PF 294	R	R	I	S	S	R	I	S	I	S	S	I	I
PF 297	R	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S
PF 597	R	I	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PF 599	R	I	I	I	S	R	I	S	S	S	S	S	S
PF 601	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PF 604	R	R	I	I	S	R	S	I	I	I	S	S	S
PF 611	R	I	R	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
PF 614	R	I	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S
PF 617	R	R	I	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S

Quadro 8: Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de vibrios do Canal de São Sebastião

Isolados	Ampicilina	Cefoxitina	Cefotaxima	Cefepima	Meropenem	Cefalotina	Ácido Nalidíxico	Ciprofloxaxina	Estreptomicina	Gentamicina	Tetraciclina	Cloranfenicol	Trimetroprima
PF 79	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
PF 84	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
PF 100 (1)	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PF 100 (2)	I	S	I	I	S	R	S	S	S	S	I	S	S
PF 101	R	S	S	S	S	R	S	S	I	S	I	S	R
PF 104	R	S	S	S	S	R	S	I	I	S	S	S	R
PF 107	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PF 111 (1)	I	S	I	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
PF 111 (2)	I	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PF 114	R	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PF 127 (1)	I	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
PF 127 (2)	I	S	I	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PF 134	R	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S
PF 138	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PF 140	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
PF 143 (1)	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PF 143 (2)	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PF 144	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PF 147	R	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	I
PF 145	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
PF 146 (1)	R	I	I	S	S	R	S	S	R	I	I	S	S
PF 146 (2)	I	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	I	S
PF 149	R	I	I	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S
PF 154	R	I	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PF 156	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
PF 159	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PF 320	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I
PF 322	R	S	I	S	S	I	S	S	I	S	I	S	I
PF 323	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S
PF 324	R	S	I	S	S	R	S	I	I	S	S	S	I
PF 326 (1)	R	R	I	S	S	R	I	I	S	S	S	S	S
PF 326 (2)	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PF 329	R	I	I	S	S	R	S	I	S	S	S	S	I
PF 335	R	I	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PF 336	R	S	I	R	S	I	S	S	I	S	S	S	I
PF 412	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PF 414	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PF 445	R	I	R	R	S	R	S	S	I	S	S	S	I
PF 448	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PF 449	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PF 453	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PF 544	R	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
PF 555	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PF 576	R	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PF 577	R	I	I	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S
PF 578	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I
PF 582	R	I	I	S	S	I	S	I	I	I	I	S	R
PSS 16	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PSS 18	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S
PSS 118	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PSS 126	R	I	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I
PSS 134	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PSS 163	R	S	S	R	S	I	S	S	I	S	S	S	S
PSS 181	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PSS 183	I	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PSS 186	I	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PSS 250	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PSS 297	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PSS 298	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R
PSS 299	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	I
PSS 319	I	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S
PSS 339	S	S	I	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S
PSS 372	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
PSS 374	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I
PSS 380	R	R	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
PSS 399	R	I	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	I
PSS 405	R	S	I	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
PSS 419	R	S	S	S	S	I	S	I	R	S	S	S	S
PSS 422	S	S	I	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PSS 434	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PSS 436	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
PSS 445	I	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PSS 484	I	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PSS 485	I	S	I	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PSS 488	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PSS 492	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PSS 505	I	I	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
PSS 506	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: S – susceptível; I – intermediário; R – resistente

Quadro 9- Perfis de susceptibilidade de *Vibrio* spp. por amostra e local de coleta

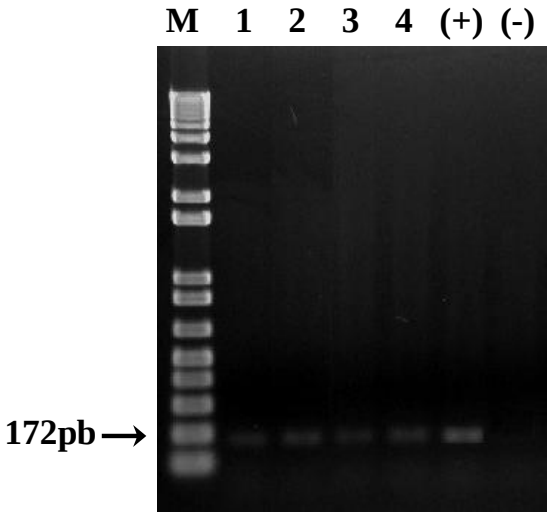
Perfis	Ubatuba			Santos			São Sebastião		
	A	**P**	**B**	**A**	**P**	**B**	**A**	**P**	**B**
Perfil 1- AMP	2		1	6		2	6	5	4
Perfil 2- CFL		2		1			8	5	3
Perfil 3- CFO				2				1	
Perfil 4- CPM				1			1		
Perfil 5- EST				2					
Perfil 6- GEN				2					
Perfil 7- NAL									
Perfil 8- AMP+CFL	5	1	1	4	1	1	3	5	5
Perfil 9- AMP+CFO				2			1		
Perfil 10- AMP+CPM							1		1
Perfil 11- AMP+EST					1		2		
Perfil 12- AMP+TRI							1		
Perfil 13- CFL+GEN								1	1
Perfil 14- CFL+EST				1			1		
Perfil 15- CFO+CLO							1		
Perfil 16- EST+TRI				1					
Perfil 17- AMP+CFL+CFO		1	2	1	1			1	
Perfil 18- AMP+CFL+CLO							2		
Perfil 19- AMP+CFL+CTX			1						1
Perfil 20- AMP+CFL+EST				2					1
Perfil 21- AMP+CFL+GEN					1			1	
Perfil 22- AMP+CFL+TET									1
Perfil 23- AMP+CFL+TRI								2	
Perfil 24- AMP+EST+GEN				1					
Perfil 25- AMP+CIP+NAL				1					
Perfil 26- AMP+CFL+CPM+CTX								1	
Perfil 27- CFL+CFO+CTX+GEN								1	

Legenda: AMP: ampicilina; CFL: cefalotina; CFO: cefoxitina; CPM: cefepima. EST: estreptomicina; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalixidílico; TRI: trimetoprima. A: água do mar; P: plâncton; B: bivalves.

5.4 Detecção dos genes associados à virulência: *ctxA*, *tcpA*, *tdh*, *trh* e *stn/sto*

Todos os isolados de *Vibrio* spp. foram submetidos à PCR utilizando iniciadores específicos para cada gene responsável pela virulência, não se evidenciando a presença de *ctxA*, *tcpA*, *tdh*, *trh*. Entretanto, 4 isolados de água do mar da Baixada Santista foram positivos para *stn/sto* (Figura 6).

Figura 6- Amplificação do gene de *stn/sto* com 172 pb



Legenda: M - marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), 1- PF482, 2- PF620, 3- PF623-1, 4- PF623-2, (+) controle positivo e (-) controle negativo da reação.

5.5 Análise dos sequenciamentos dos genes *pyrH, recA, rpoA e rpoD*

5.5.1 Canal de São Sebastião

Os 78 isolados do Canal de São Sebastião foram submetidos ao sequenciamento dos genes *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD.*

A árvore filogenética gerada para os dados do gene *pyrH* (aproximadamente 500 nucleotídeos), apresentou 28 isolados agrupando-se com *V. fluvialis,* 22 com *V. alginolyticus,* 9 com *V. campbellii,* 5 com *V. diabolicus,* 4 com *V. rotiferianus* e 4 com *V. harveyi* (Figura 7). Observou-se, também, pela matriz de similaridade do programa *Mega 5.05,* que os menores valores de similaridade foram encontrados nos isolados PF79 (que apresentou semelhança de 85,8% com o *V. tubiashii*), PSS372 (91,3% similar com *V. maritimus*), PSS422 (92,4% similar com *V. atypicus*), PSS380 (94,9% similar com *V. rotiferianus*) e no isolado PF107 (96,2% similar com *V. fluvialis*). O isolado PSS250 teve semelhança de 97,5% com o *V. coralliilyticus,* PF147 foi 99% similar com *V. parahaemolyticus* e PF578 foi 99,5% similar com *V. neocaledonicus*.

Figura 7- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *pyrH* de *Vibrio* spp. isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no NCBI.

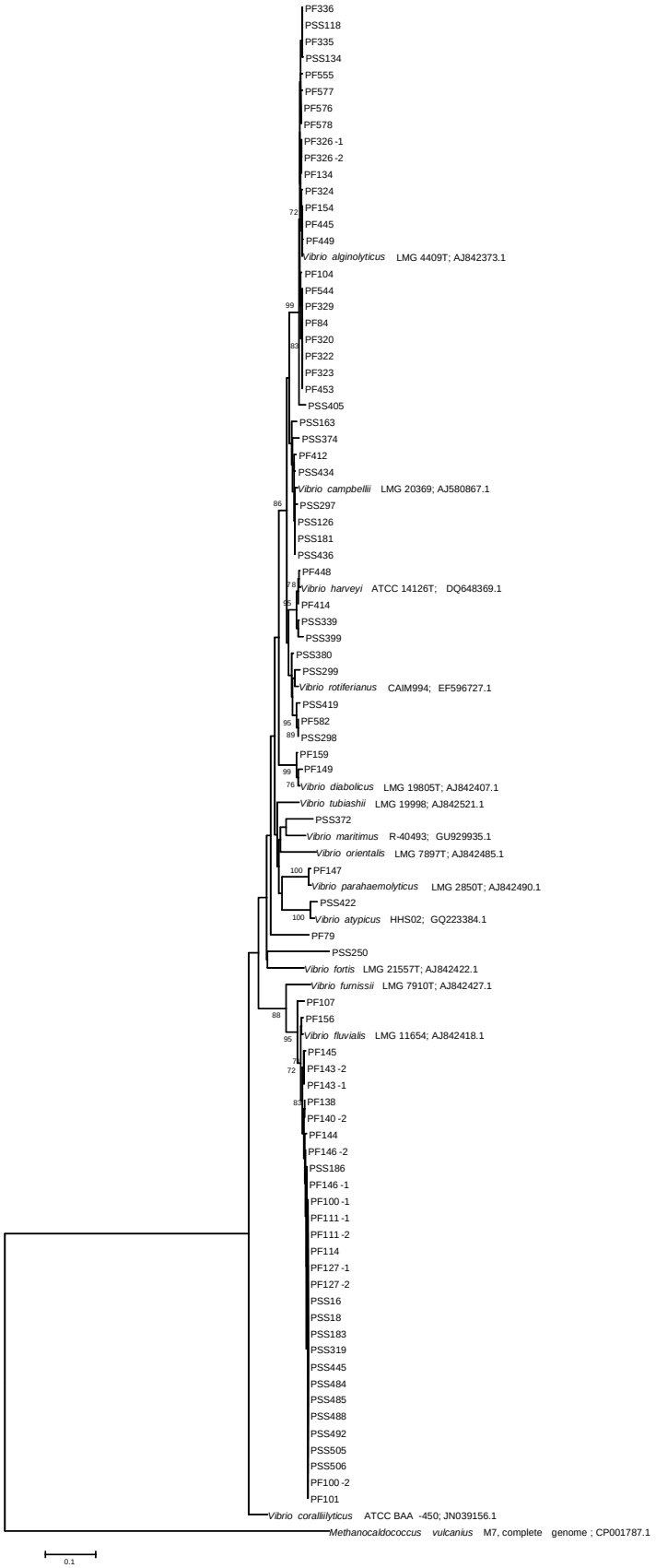
Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

Através da análise das sequências do gene *recA* (aproximadamente 700 nucleotídeos), foi possível observar que 31 isolados agruparam-se com *V. fluvialis*, 23 com *V. alginolyticus*, 8 com *V. harveyi* e 7 com *V. campbellii* (Figura 8). Pela matriz de similaridade do programa *Mega 5.05*, o isolado PSS250 teve semelhança de 81,8% com o *V. fortis*, a semelhança do PF79 com *V. alginolyticus* foi de 87,3% e de 85,5% com o *V. tubiashii* e com *V. fortis.*

As sequências do gene *rpoA* (aproximadamente 800 nucleotídeos) dos isolados foram comparadas com as sequências disponibilizadas no GenBank do NCBI. Pela construção da árvore filogenética, 30 isolados agruparam-se com *V. fluvialis*, 24 com *V. alginolyticus*, 7 com *V. campbellii*, 5 com *V. rotiferianus*, 4 com *V. harveyi* e 2 com *V. diabolicus* (Figura 9). Com relação a este gene, observou-se, através da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05*, que os isolados PF79 e PSS422 apresentaram semelhanças de 97,7% e 94,2% com o *V. tubiashii*, respectivamente e que PSS372 foi 94,6% similar com *V. maritimus*.

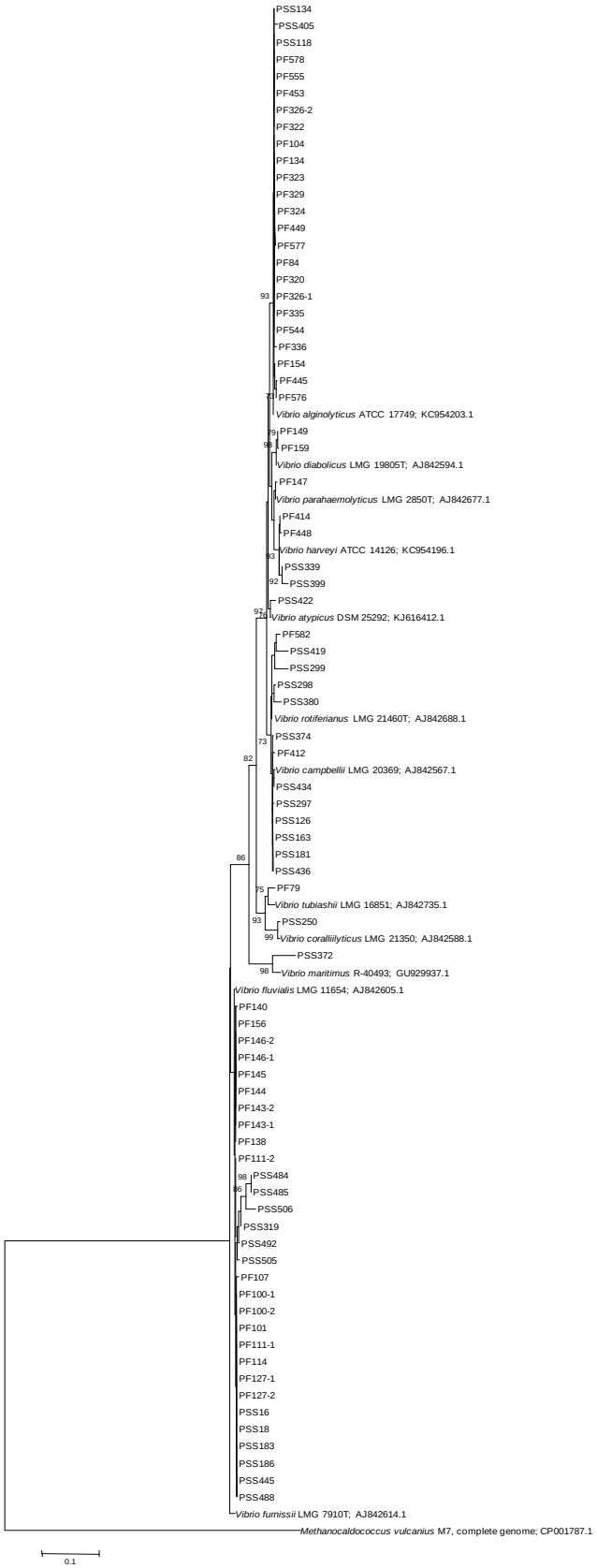
Utilizando o gene *rpoD* (aproximadamente 800 nucleotídeos), os isolados foram sequenciados e comparados com as sequências disponibilizadas no GenBank do NCBI. Pela construção da árvore filogenética, 31 isolados agruparam-se com *V. fluvialis*, 23 com *V. alginolyticus*, 9 com *V. campbellii*, 4 com *V. rotiferianus* e 4 com *V. harveyi* (Figura 10). Por meio da análise deste gene, observou-se pela matriz de similaridade do programa *Mega 5.05*, que os menores valores de similaridade foram encontrados no isolado PF79, que apresentou semelhança de 76% com *V. coralliilyticus* e de 74% com *V. orientalis* e do PSS422 que foi 81,0% similar com *V. coralliilyticus* e 80,0% com o *V. orientalis*, em PF149 e PF159 a similaridade ao *V. alginolyticus* foi de 89,6% e 89% respectivamente, e PF107 foi 93,4% similar com *V. fluvialis.*

Figura 8- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *recA* de *Vibrio* spp. isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no NCBI.



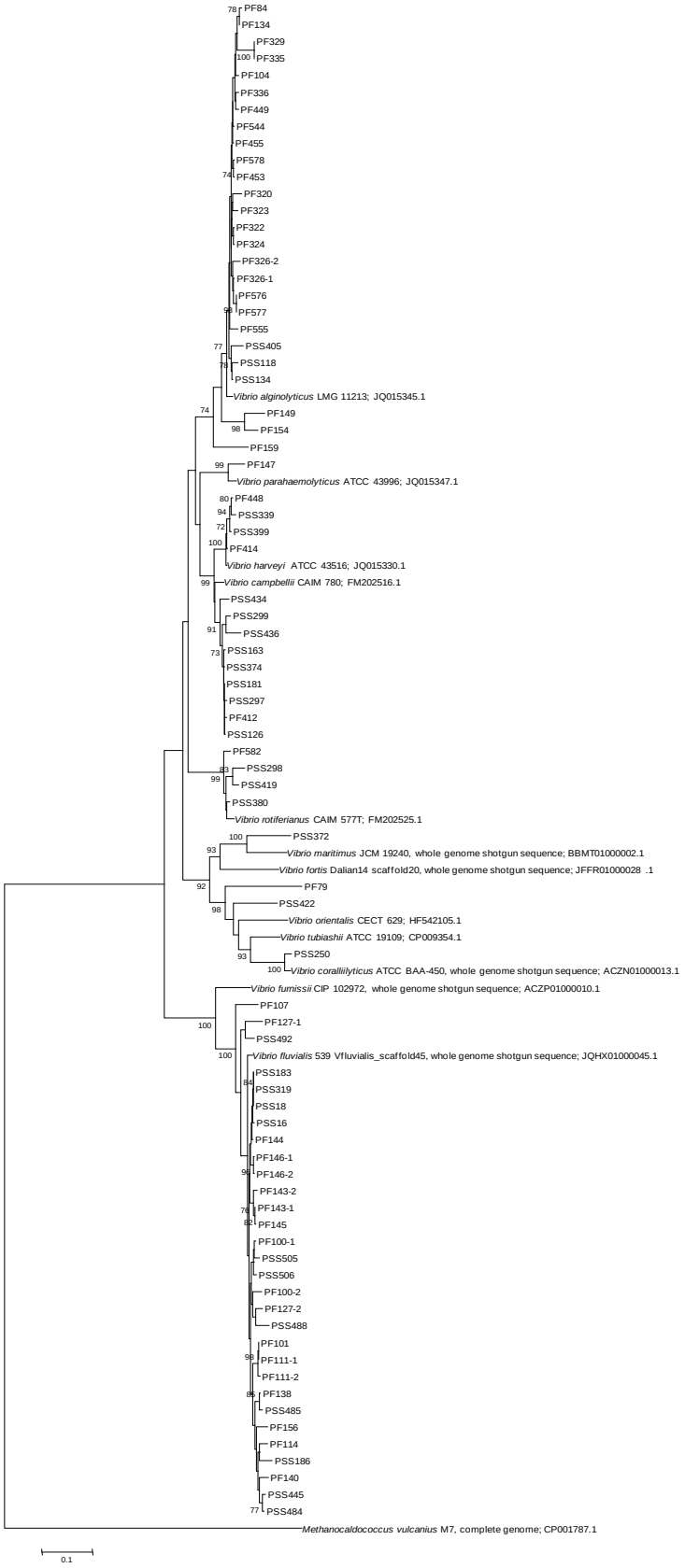
Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

Figura 9- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoA* de *Vibrio* spp. isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no NCBI.



Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura

Figura 10- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoD* de *Vibrio* spp. isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no NCBI.



Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

Os resultados obtidos pelos sequenciamentos dos genes *pyrH, recA, rpoA e rpoD* foram comparados e algumas divergências foram notadas (Quadro 10): 1- o isolado PF79 agrupou-se com *V. tubiashii* pelos genes *pyrH* e *rpoA,* com *V. fortis* pelo gene *recA* e teve semelhança de 76% com *V. coralliilyticus* e de 74% com *V. orientalis* pelo gene *rpoD*; 2- PF324 agrupou-se com *V. alginolyticus* pelos genes *recA, rpoA e rpoD e com V. diabolicus* pelo gene *pyrH*; 3- *Vibrio neocaledonicus* só está na base de dados do gene *pyrH,* e por isso PF578 agrupou-se com esta espécie, já pelos genes *recA, rpoA e rpoD* agrupou-se com *V. alginolyticus;* 4- os isolados PF149 e PF159 agruparam-se com *V. diabolicus* pelos genes *pyrH, recA e rpoA* e com *V. alginolyticus* pelo *rpoD,* PF422 agrupou-se com *V. atypicus* pelos genes *pyrH, recA e rpoA* e com *V. orientalis* pelo *rpoD,* uma vez que *V. diabolicus e V. atypicus* não estão na base de dados do gene *rpoD*; 5- PSS118 agrupou-se com *V. alginolyticus* pelos genes *recA, rpoA* e *rpoD,* e com *V.fluvialis* pelo *pyrH;* 6- PSS505 agrupou-se com *V. fluvialis* pelos genes *recA, rpoA* e *rpoD,* e com *V. alginolyticus* pelo *pyrH;* 7- PSS250 agrupou-se com *V. coralliilyticus* pelos genes *pyrH, rpoA* e *rpoD* e com *V. fortis* pelo *recA;* 8- PSS299 agrupou-se com *V. campbellii* pelos genes *pyrH* e *rpoD* e com *V. rotiferianus* pelos genes *recA* e *rpoA.*

Quadro 10: Sequenciamento dos genes *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *rpoD* dos isolados do Canal de São Sebastião

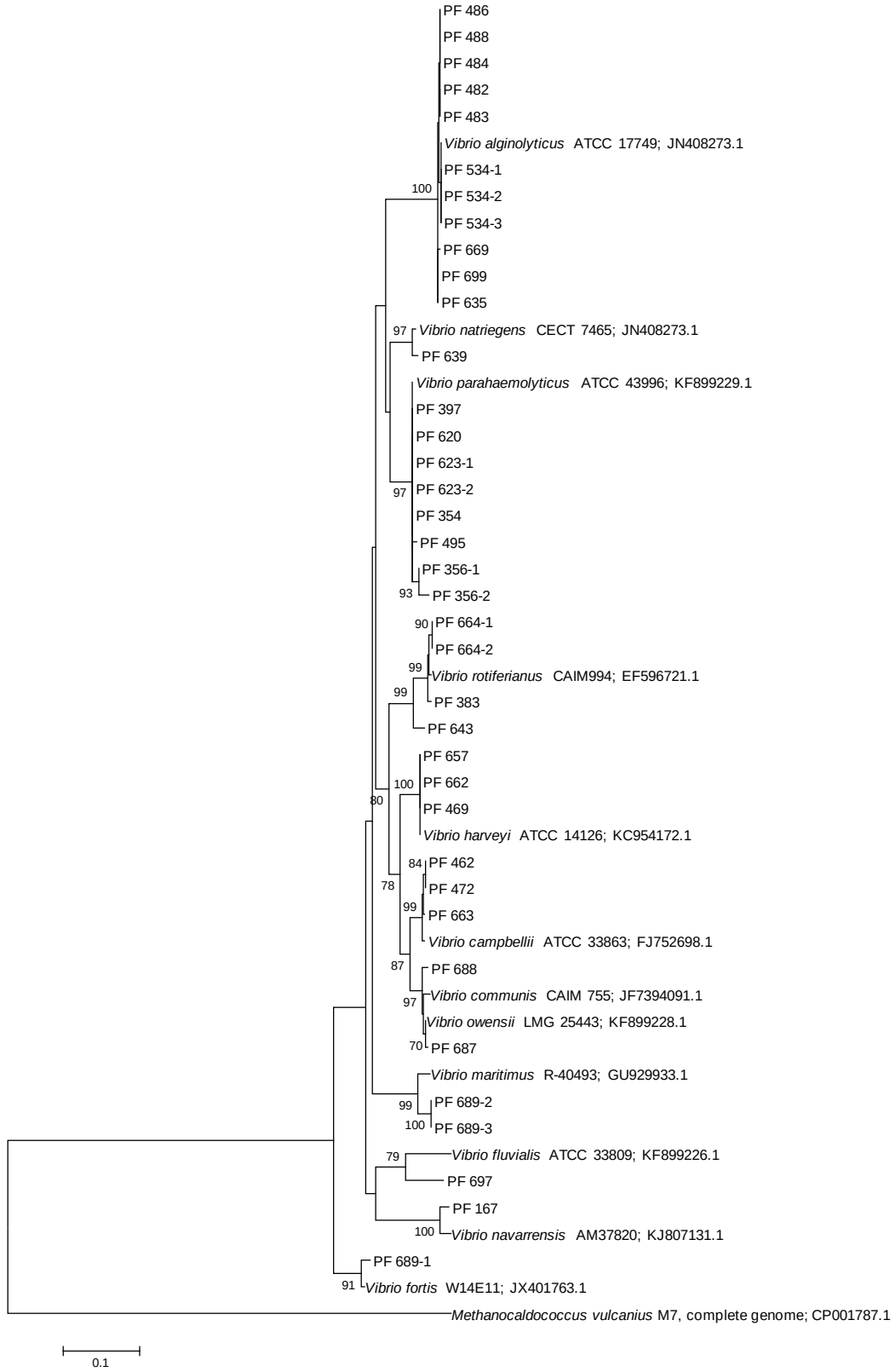
ISOLADOS	*pyrH*	*recA*	*rpoA*	*rpoD*
PF 79	*Vibrio tubiashii*	*Vibrio*	*Vibrio tubiashii*	*Vibrio*
PF 84	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 100 (1)	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 100 (2)	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 101	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 104	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 107	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 111 (1)	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 111 (2)	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 114	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 127 (1)	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 127 (2)	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 134	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 138	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 140	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 143 (1)	*Vibrio diabolicus*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 143 (2)	*Vibrio diabolicus*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 144	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 145	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 146 (1)	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 146 (2)	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 147	*Vibrio parahaemolyticus*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Vibrio parahaemolyticus*
PF 149	*Vibrio diabolicus*	*Vibrio diabolicus*	*Vibrio diabolicus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 154	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 156	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF 159	*Vibrio diabolicus*	*Vibrio diabolicus*	*Vibrio diabolicus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 320	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 322	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 323	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 324	*Vibrio diabolicus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 326 (1)	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 326 (2)	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 329	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 335	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 336	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 412	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PF 414	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*
PF 445	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 448	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*
PF 449	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 453	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 544	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 555	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 576	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 577	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 578	*Vibrio neocaledonicus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF 582	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*
PSS 16	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 18	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 118	*Vibrio fluvialis*	*V.alginolyticus*	*V.alginolyticus*	*V.alginolyticus*
PSS 126	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PSS 134	*V.alginolyticus*	*V.alginolyticus*	*V.alginolyticus*	*V.alginolyticus*
PSS 163	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PSS 181	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PSS 183	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 186	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 250	*Vibrio coralliilyticus*	*Vibrio fortis*	*Vibrio coralliilyticus*	*Vibrio coralliilyticus*
PSS 297	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PSS 298	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*
PSS 299	*Vibrio campbellii*	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio campbellii*
PSS 319	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 339	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*
PSS 372	*Vibrio maritimus*	*Vibrio maritimus*	*Vibrio maritimus*	*Vibrio maritimus*
PSS 374	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PSS 380	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*
PSS 399	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi*
PSS 405	*V.alginolyticus*	*V.alginolyticus*	*V.alginolyticus*	*V.alginolyticus*
PSS 419	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*	*Vibrio rotiferianus*
PSS 422	*Vibrio atypicus*	*Vibrio atypicus*	*Vibrio atypicus*	*Vibrio orientalis*
PSS 434	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PSS 436	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PSS 445	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 484	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 485	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 488	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 492	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 505	*V.alginolyticus*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PSS 506	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*

5.5.2 Baixada Santista

Todos os 37 isolados da Baixada Santista foram submetidos ao sequenciamento dos genes *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD.*

Pela construção da árvore filogenética construída a partir do gene *pyrH* (aproximadamente 500 nucleotídeos), nota-se que 11 isolados agruparam-se com *V. alginolyticus,* 8 isolados com *V. parahaemolyticus,* 4 isolados com *V. rotiferianus,* 3 isolados com *V. harveyi,* 3 isolados com *V. campbellii* e que os isolados PF689-2 e PF989-3 ficaram mais relacionados com *V. maritimus* (Figura 11). Observou-se, também, a partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05,* que o isolado PF167 apresentou semelhança de 97,5% com o *V. navarrensis,* PF639 foi 98,9% com *V. natriegens,* PF697 foi 89,5% similar com *V. fluvialis* e PF687 e PF688 tiveram 98,6% de similaridade entre si, e de 98,9% com *V. owensii* e *V. communis,* respectivamente.

Figura 11- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *pyrH* de *Vibrio* spp. isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no NCBI.



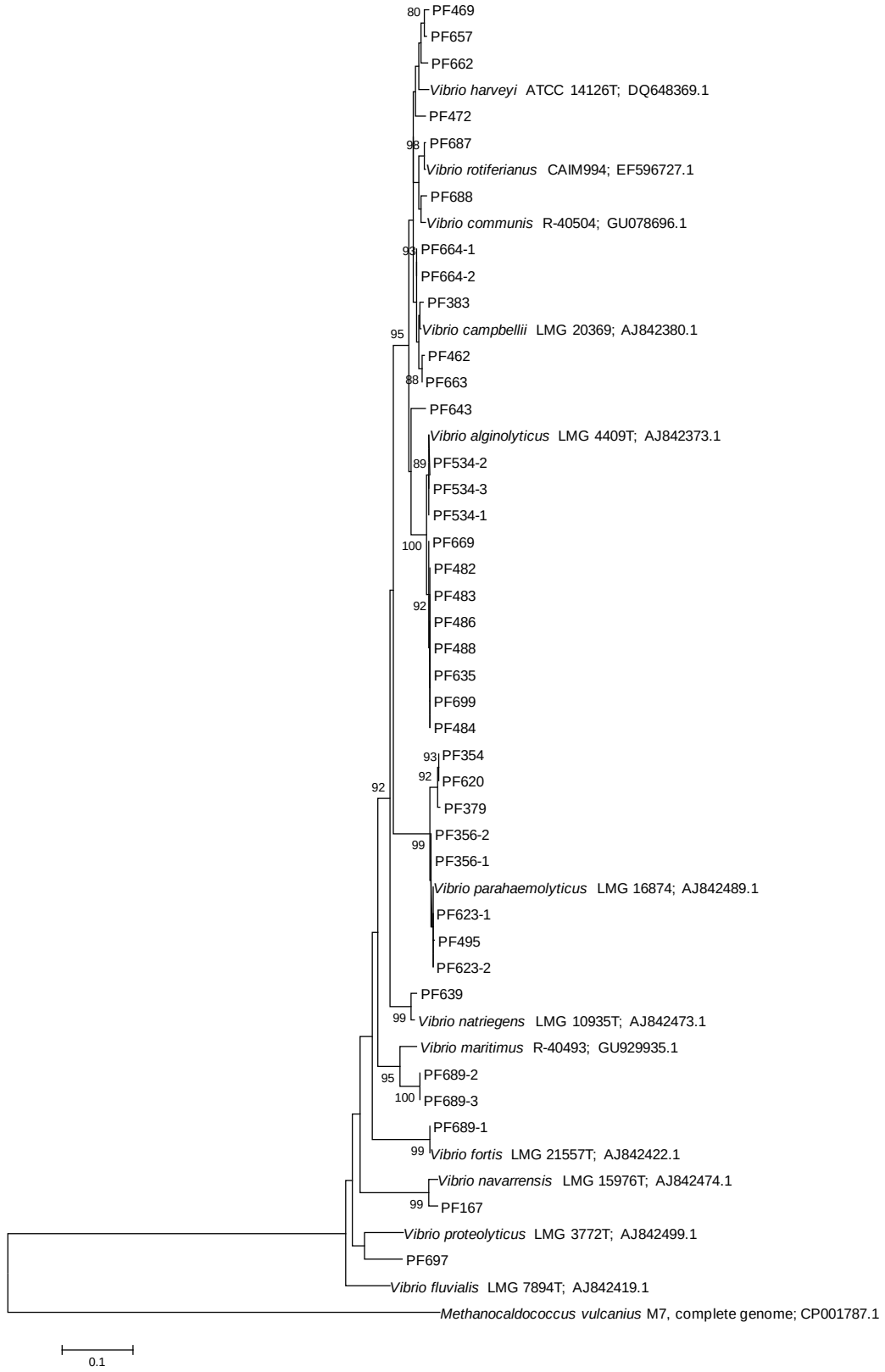
Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

A árvore filogenética baseada no gene *recA* (aproximadamente 700 nucleotídeos) foi construída com 37 isolados de *Vibrio* spp. e as sequências obtidas foram comparadas com as disponibilizadas no GenBank do NCBI. Notou-se que, pela construção da árvore filogenética, 11 isolados agruparam-se com *V. alginolyticus,* 8 com *V. parahaemolyticus,* 5 apresentaram maior similaridade com *V. campbellii* e 4 com *V. harveyi,* 2 com *V. maritimus,* F689-1 com *V. fortis,* PF167 com *V. navarrensis,* PF639 com *V. natriegens,* PF687 com *V. rotiferianus,* PF688 com *V. communis* e PF697 com *V. proteolyticus* (Figura 12). Pela matriz de similaridade do programa *Mega 5.05,* os isolados PF689-2 e PF689-3 foram 100% similares, assim como PF664-1 e PF664-2, e, PF534-1, PF534-2 e PF534-3. O isolado PF167 teve semelhança de 97,5% com o *V. navarrensis,* PF688 foi 98,4% similar com *V. communis*, PF383 foi 97,8% similar com *V. campbellii*. O isolado PF643 apresentou 96,3% de semelhança com *V. campbellii* e com *V. communis.* O menor valor de similaridade foi observado no isolado PF697 que foi 89,3% semelhante com *V. proteolyticus.*

Pela construção da árvore filogenética baseada no gene *rpoA* (aproximadamente 800 nucleotídeos), dos 37 isolados, 11 isolados agruparam-se com *V. alginolyticus,* 8 com *V. parahaemolyticus*, 4 com *V. rotiferianus,* 3 com *V. campbellii,* 3 com *V. harveyi* (Figura 13). Observou-se, através da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05,* que os isolados PF689-2 e PF689-3 tiveram 100% de similaridade entre si, e de 98,2% com *V. maritimus;* PF PF689-1 teve 99,7% de similaridade com *V.fortis*, assim como o PF639 com o *V.natriegens*; em PF167 a similaridade foi de 97,1% com *V. navarrensis*; PF697 foi 97,3% similar com *V. fluvialis*. O isolado PF688 foi 99,9% similar ao PF687 e 99,6% ao *V. communis*.

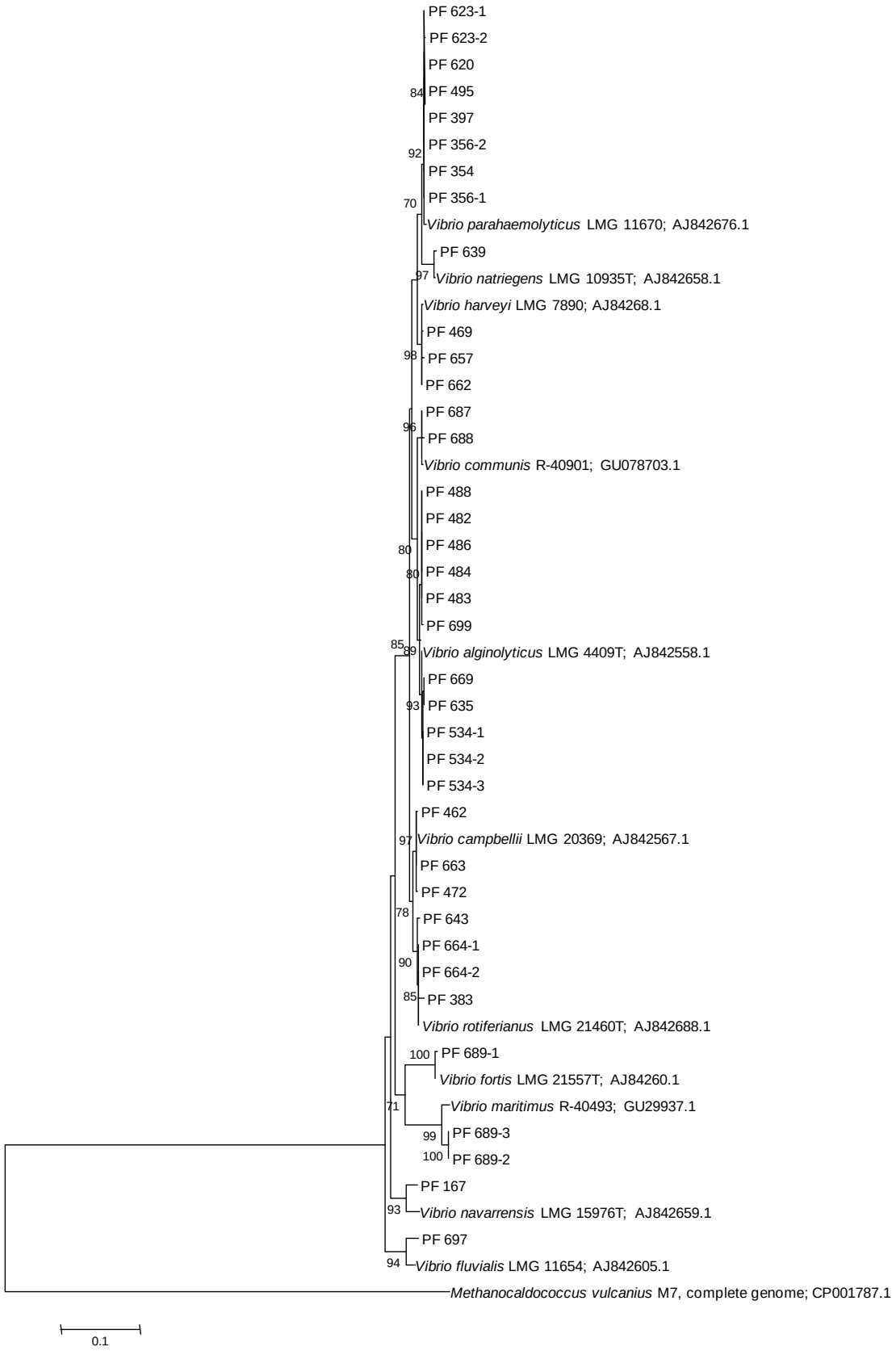
A árvore filogenética baseada no gene *rpoD* (aproximadamente 700 nucleotídeos) foi construída com os 37 isolados de *Vibrio* spp., e 11 isolados agruparam-se com *V. alginolyticus,* 8 com *V. parahaemolyticus*, 4 com *V. rotiferianus,* 2 com *V.harveyi,* 2 com *V. communis* e o PF639 com *V. natriegens* (Figura 14). A partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05,* os isolados PF689-2 e PF689-3 foram 100% similares entre si e 95,8% com *V. maritimus,* e o isolado PF689-1 se agrupou com *V. fortis* com 97,4% de similaridade. Três isolados (PF469, PF657 e PF662) se agruparam, porém não tiveram a espécie definida: PF469 e PF657 apresentaram 95,8% de similaridade com *V. campbellii* e 95,1% com *V. harveyi*, enquanto em PF662 a similaridade foi de 96,7% e 96,6%, respectivamente. O isolado PF167 agrupou-se com *V. navarrensis* com 91% de similaridade e PF697 com 83% com *V. fluvialis*.

Figura 12- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *recA* de *Vibrio* spp. isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no NCBI.



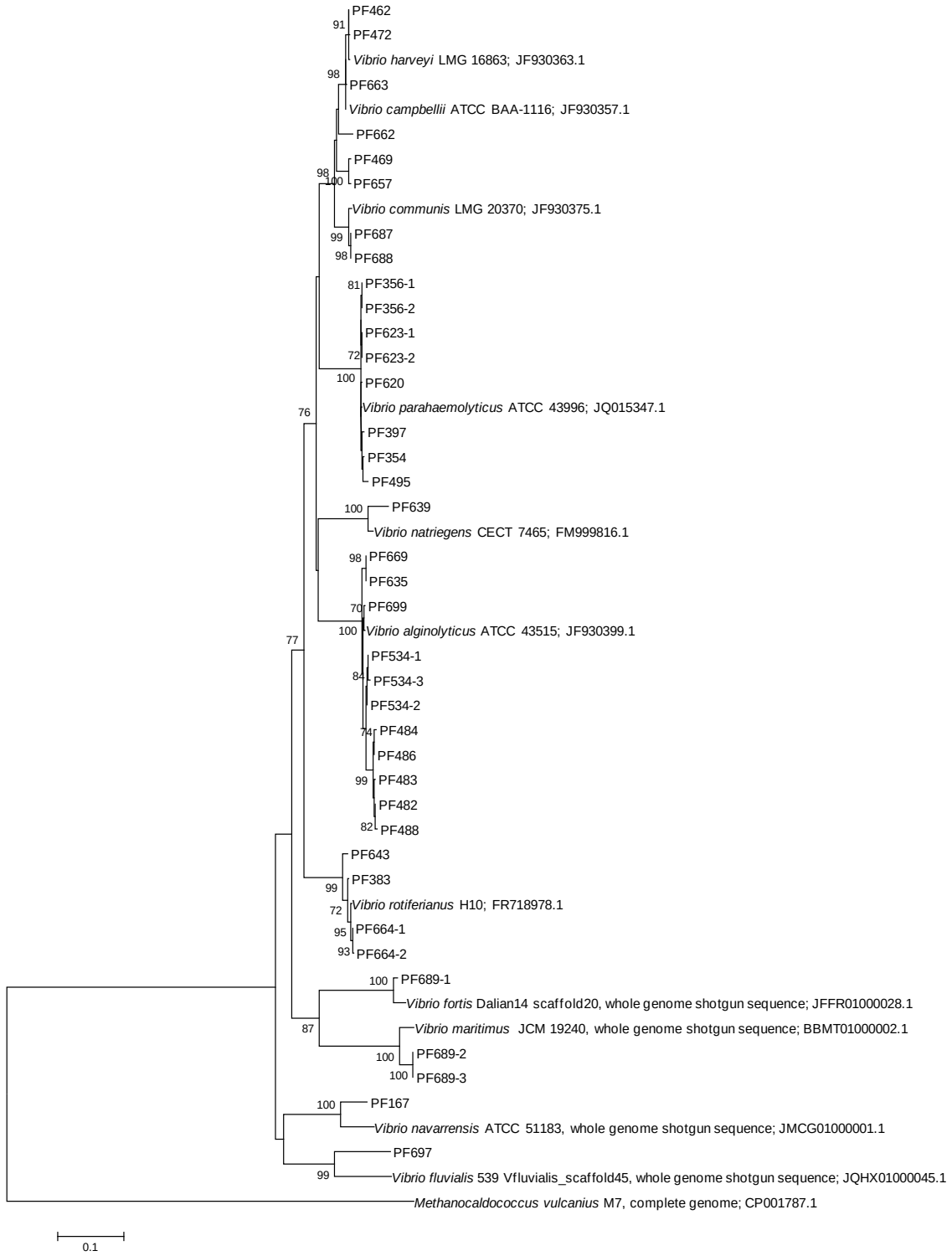
Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

Figura 13- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoA* de *Vibrio* spp. isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no NCBI.



Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

Figura 14- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoD* de *Vibrio* spp. isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no NCBI.



Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

Os resultados obtidos pelos sequenciamentos dos genes *pyrH, recA, rpoA e rpoD* foram comparados e algumas divergências foram notadas (Quadro 11): 1- pelos genes *pyrH*, *rpoA* e *rpoD*, PF687 agrupou-se com *V. communis* e pelo gene *recA* agrupou-se com *V. rotiferianus*; 2- PF472 agrupou-se com *V. harveyi* pelos genes *recA* e *rpoD*, e com *V. campbellii* pelos genes *pyrH* e *rpoA*; 3- PF383, PF643, PF664-1 e PF664-2 agruparam-se com *V. rotiferianus* pelos genes *pyrH, rpoA* e *rpoD* e não tiveram a espécie definida pelo gene *recA;* 4- PF462 agrupou-se com *V. campbellii* pelos genes *pyrH, recA* e *rpoA*, e com *V. harveyi* pelo gene *rpoD;* 5-PF697 agrupou-se com *V. fluvialis* pelos genes *pyrH, rpoA* e *rpoD*, e com *V. proteolitycus* pelo gene *recA;* 6- pelo gene *rpoD* não foi possível definir a espécie de três isolados: PF469, PF662 e PF697 apresentando 95,8% de similaridade com *V. campbellii* e 95,1% com *V. harveyi*, enquanto em PF662 a similaridade foi de 96,7% e 96,6% respectivamente, o que demonstra que este gene não diferencia perfeitamente *V. campbellii* e *V. harveyi.*

Quadro 11: PCR do gene responsável pela virulência *stn/sto* e resultado do sequenciamento dos genes *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *rpoD* dos isolados da Baixada Santista

ISOLADOS	stn/sto	pyrH	recA	rpoA	rpoD
PF 167	N	V.navarrensis	V.navarrensis	V.navarrensis	V.navarrensis
PF 354	N	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus
PF 356 (1)	N	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus
PF 356 (2)	N	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus
PF 383	N	V.rotiferianus	V.campbellii	V.rotiferianus	V.rotiferianus
PF 397	N	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus
PF 462	N	V.campbellii	V.campbellii	V.campbellii	V.harveyi
PF 469	N	V.harveyi	V.harveyi	V.harveyi	V. campbellii ou V. harveyi
PF 472	N	V.campbellii	V.harveyi	V.campbellii	V.harveyi
PF 482	P	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus
PF 483	N	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus
PF 484	N	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus
PF 486	N	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus
PF 488	N	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus
PF 495	N	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus
PF 534 (1)	N	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus
PF 534 (2)	N	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus
PF 534 (3)	N	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus
PF 620	P	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus
PF 623 (1)	P	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus
PF 623 (2)	P	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus	V.parahaemolyticus
PF 635	N	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus
PF 639	N	V.natriegens	V.natriegens	V.natriegens	V.natriegens
PF 643	N	V.rotiferianus	V. campbellii ou V. communis	V.rotiferianus	V.rotiferianus
PF 657	N	V.harveyi	V.harveyi	V.harveyi	V. campbellii ou V. harveyi
PF 662	N	V.harveyi	V.harveyi	V.harveyi	V. campbellii ou V. harveyi
PF 663	N	V.campbellii	V.campbellii	V.campbellii	V.campbellii
PF 664 (1)	N	V.rotiferianus	V.campbellii	V.rotiferianus	V.rotiferianus
PF 664 (2)	N	V.rotiferianus	V.campbellii	V.rotiferianus	V.rotiferianus
PF 669	N	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus
PF 687	N	V.owensii	V.rotiferianus	V.communis	V.communis
PF 688	N	V.communis	V.communis	V.communis	V.communis
PF 689 (1)	N	V.fortis	V.fortis	V.fortis	V.fortis
PF 689 (2)	N	V.maritimus	V.maritimus	V.maritimus	V.maritimus
PF 689 (3)	N	V.maritimus	V.maritimus	V.maritimus	V.maritimus
PF 697	N	V.fluvialis	V.proteolyticus	V.fluvialis	V.fluvialis
PF 699	N	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus	V.alginolyticus

Legenda: N – negativo; P – positivo

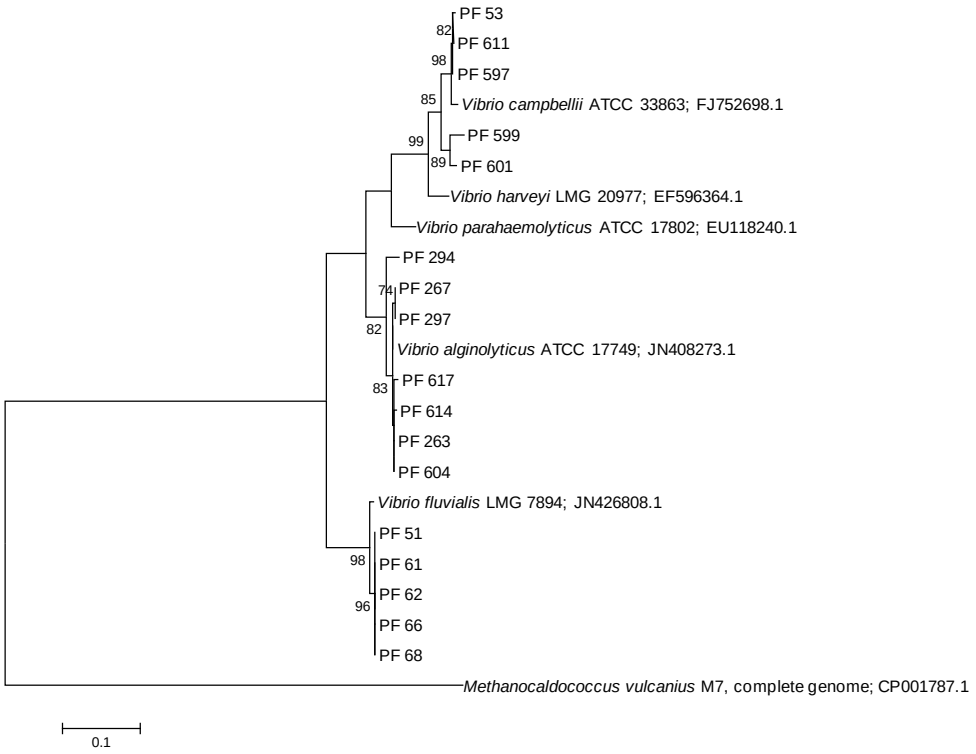
5.5.3 Ubatuba

Os 17 isolados de vibrios de Ubatuba foram submetidos ao sequenciamento dos genes *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *rpoD*.

Pela construção da árvore filogenética baseada no gene *pyrH* (aproximadamente 500 nucleotídeos), dos 17 isolados, 7 isolados estavam mais relacionados com *V. alginolyticus* e 5 com *V.*

fluvialis (Figura 15). A partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05,* 5 isolados (PF51, PF61, PF62, PF66 e PF68) apresentaram 100% de similaridade, e foram identificados como *V. fluvialis* com 99,9%, 3 isolados (PF53, PF611 e PF597) foram 99,5% similares com *V. campbellii.* Sete isolados foram classificados como *V. alginolyticus*, seis deles com 99,7% de similaridade e o isolado PF294 com 97,7%. Os isolados PF599 e PF601 foram 97,4% similares entre si, 95,5% com o *V. campbellii* e 92,8% com o *V. harveyi.*

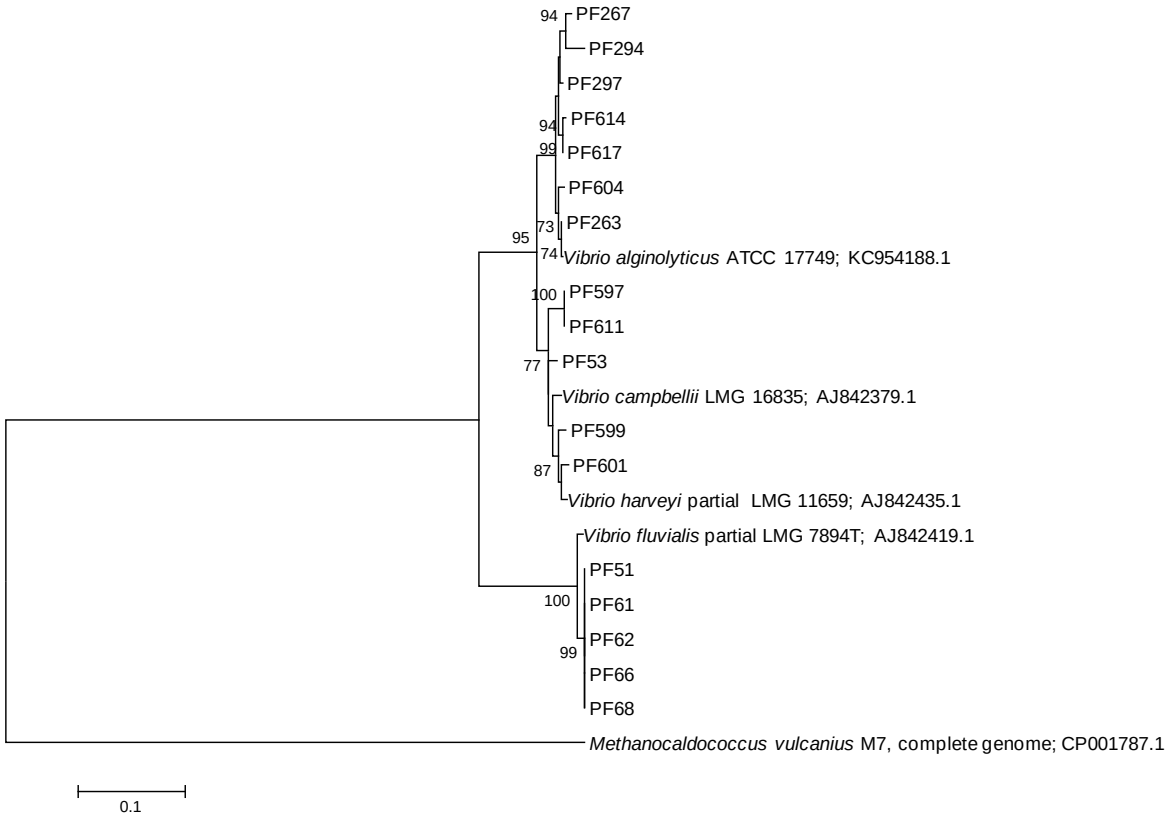
Figura 15- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *pyrH* de *Vibrio* spp. isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no NCBI.



Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

As sequências obtidas pelo sequenciamento do gene *recA* (aproximadamente 700 nucleotídeos) foram comparadas com as sequências disponibilizadas no GenBank do NCBI, e pela construção da árvore filogenética, pode-se observar que 7 isolados estavam mais relacionados com *V. alginolyticus* e 5 isolados agruparam-se com *V. fluvialis* (Figura 16). A partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05,* os 5 isolados (PF51, PF61, PF62, PF66 e PF68) identificados como *V. fluvialis* com 98,9% de similaridade pelo gene *recA.* Os isolados PF599 e PF601 foram 98,7% similares com *V. harveyi e* 98,1% com *V. campbellii.* PF53 teve o valor de similaridade de 98,1% com *V. campbellii* e os isolados PF597 e PF611 (100% similares) 97,6% com *V. campbellii.*

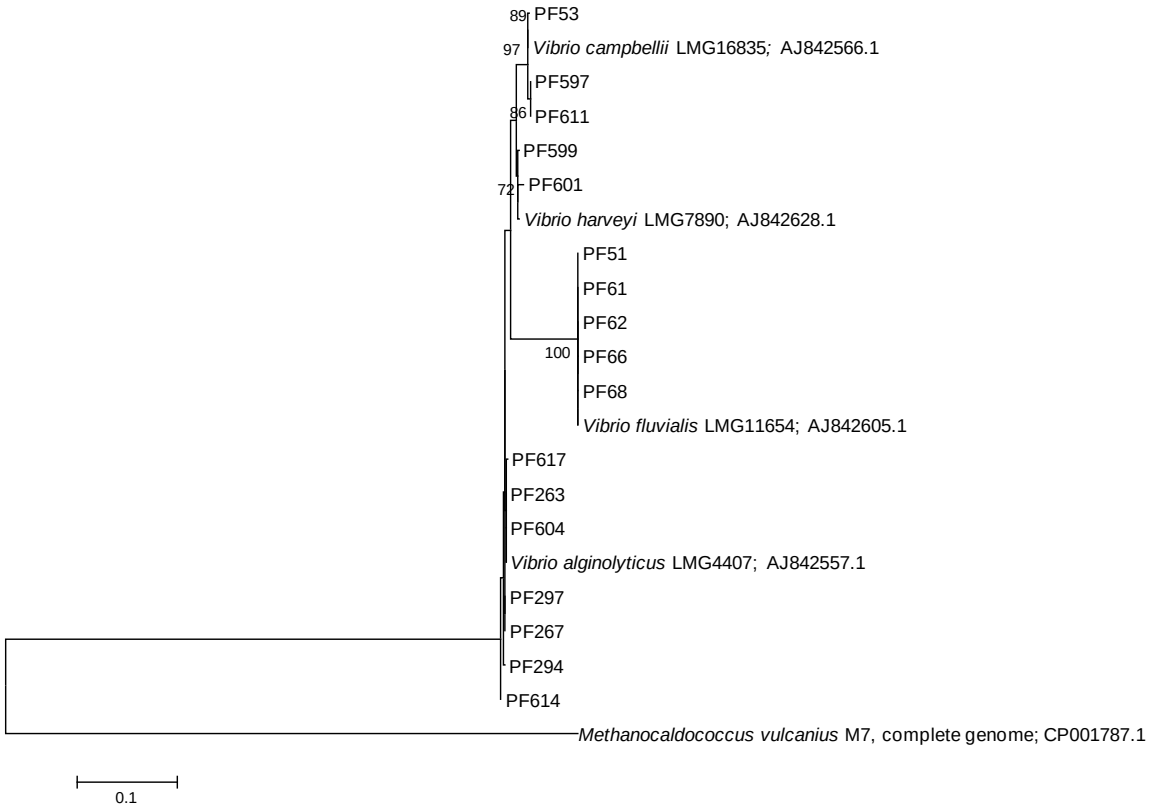
Figura 16- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *recA* de *Vibrio* spp. isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no NCBI.



Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

As sequências obtidas pelo sequenciamento do gene *rpoA* (aproximadamente 800 nucleotídeos) foram comparadas com as sequências disponibilizadas no GenBank do NCBI, e, pela construção da árvore filogenética, 7 isolados alinharam-se com *V. alginolyticus*, 5 com *V. fluvialis*, 3 com *V. campbellii* e 2 isolados com *V. harveyi.* A partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05* (Figura 17), 5 isolados (PF51, PF61, PF62, PF66 e PF68) foram identificados como *V. fluvialis* com 100% de similaridade. O isolado PF53 foi 99,9% similar com *V. campbellii*, enquanto nos isolados PF597 e PF611 (100% similares entre si) a similaridade foi de 99,7%. Já, os isolados PF599 e PF601 apresentaram similaridade de 99,7% com *V. harveyi*, 98,5% com *V. campbellii* e de 99,3% entre si.

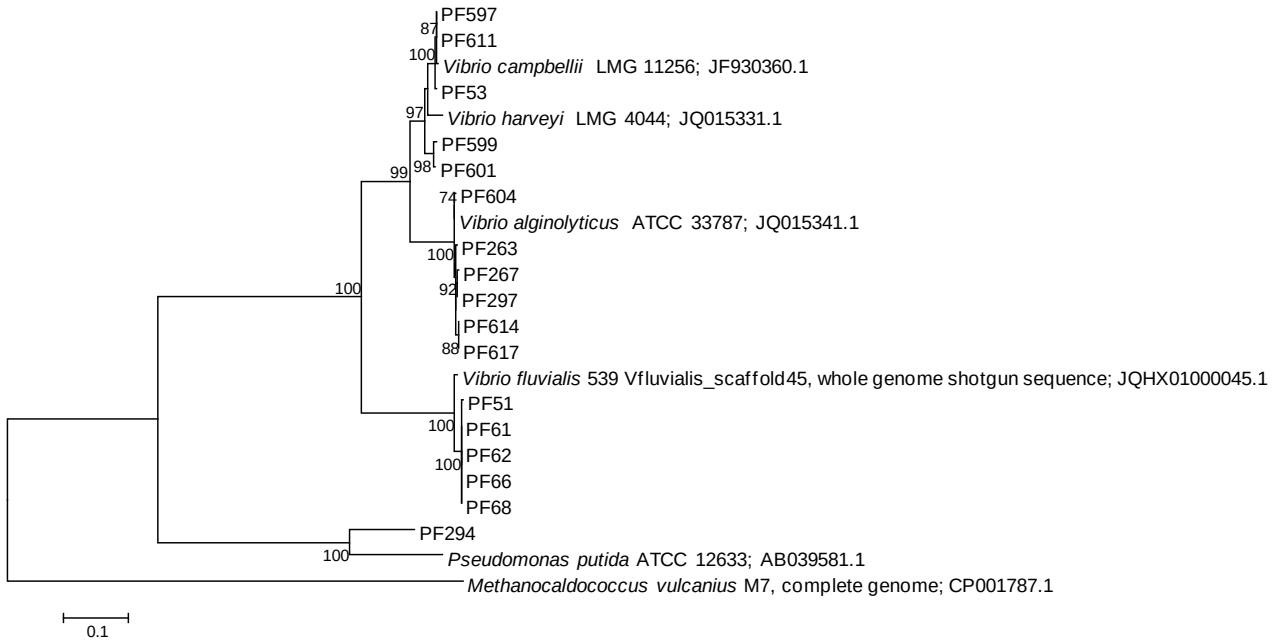
Figura 17- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoA* de *Vibrio* spp. isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no NCBI.



Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

Pela árvore filogenética do gene *rpoD* (aproximadamente 700 nucleotídeos), observou-se que 6 isolados estavam mais relacionados com *V. alginolyticus*, 3 com *V. campbellii*, PF599 e PF601 agruparam-se com *V. harveyi* (Figura 18). A partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05*, o isolado PF53 teve 99,4% de similaridade com *V. campbellii* e os isolados PF597 e PF611 tiveram 99,8% de similaridade entre si e de 99,5% e 99,7% com *V. campbellii*, respectivamente. PF599 e PF601 foram 98,8% similares entre si, 95,9% com *V. harveyi* e 95,8% com *V. campbellii*. O isolado PF294 foi 75,9% com *Pseudomonas putida*. Os isolados PF51, PF61, PF62, PF66 e PF68 foram 99,8% similares entre si e foram identificados como *V. fluvialis* 539 com 98,5% de similaridade, devido a base de dados deste gene conter poucas espécies disponíveis para a análise.

Figura 18- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *rpoD* de *Vibrio* spp. isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no NCBI.



Nota: Valores de bootstrap <70 foram removidos da figura.

Os resultados obtidos pelos sequenciamentos dos genes *pyrH, recA, rpoA e rpoD* foram comparados e algumas divergências foram notadas (Quadro 12): o gene *rpoD* possui poucas espécies disponíveis para análises em sua base de dados, desta forma foi necessário obter a sequência completa de *Vibrio fluvialis* (*Vibrio fluvialis* 539 *Vfluvialis*_scaffold45 whole genome shotgun sequence) para que os isolados PF51, PF61, PF62, PF66 e PF68 fossem identificados; 2- PF294 agrupou-se com *Pseudomonas putida* pelo gene *rpoD,* sendo similar com *V. alginolyticus* pelos genes *pyrH, recA,* e *rpoA;* 3- pelo gene *recA* os isolados PF599 e PF601 foram 98,7% similares com *V. harveyi* e 98,1% com *V. campbellii,* e pelo gene *rpoD* foram 95,9% similares com *V. harveyi* e 95,8% com *V. campbellii,* o que demonstra que estes genes não diferenciam perfeitamente *V. campbellii* e *V. harveyi.*

Quadro 12: Sequenciamento dos genes *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *rpoD* dos isolados de Ubatuba

Isolados	*pyr* H	*rec* A	*rpo* A	*rpo* D
PF51	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF53	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PF61	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF62	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF66	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF68	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*	*Vibrio fluvialis*
PF263	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF267	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF294	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Pseudomonas putida*
PF297	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF597	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PF599	*Vibrio campbellii*	*Vibrio harveyi / Vibrio campbellii*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi / Vibrio campbellii*
PF601	*Vibrio campbellii*	*Vibrio harveyi / Vibrio campbellii*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi / Vibrio campbellii*
PF604	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF611	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*	*Vibrio campbellii*
PF614	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*
PF617	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio alginolyticus*

5.6 Análise de Sequências Multilocus (MLSA)

Neste estudo, a técnica de MLSA foi realizada pelas análises conjuntas das sequências dos genes *pyrH*, *recA* e *rpoA*, uma vez que o gene *rpoD* não apresenta, atualmente, em seu banco de dados as mesmas cepas, utilizadas como referências, dos outros três genes estudados. Após as sequências dos genes serem concatenadas, os grupos ficaram mais bem estabelecidos.

As árvores filogenéticas dos genes concatenados (aproximadamente 2.000 nucleotídeos) foram construídas com os isolados de cada local de coleta, Canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba, e as sequências obtidas foram comparadas com as disponibilizadas no GenBank do NCBI.

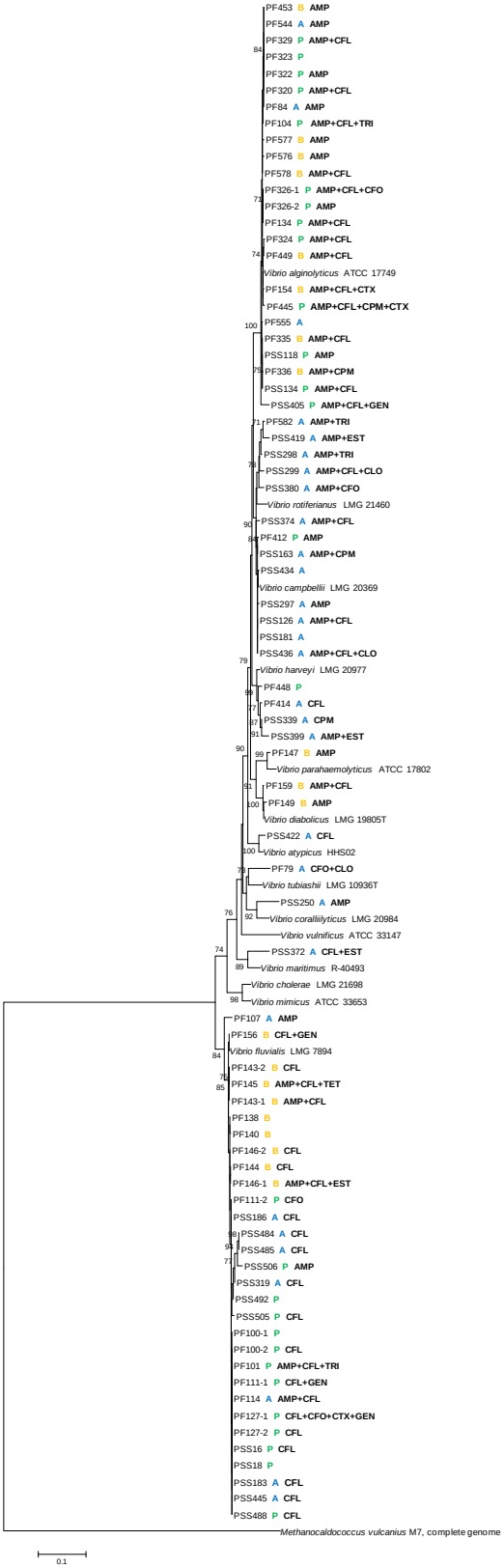
No Canal de São Sebastião (Figura 19), uma área com moderado impacto humano, com 78 isolados, a partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05*, os isolados PF149, PF324, PF578 e PSS118 foram 98,1%, 99,4%, 99,5% e 99,3% similares com *Vibrio alginolyticus*, respectivamente. PF159 foi 99,5% similar com *V. diabolicus*, PSS505 foi 99,4% com *V. fluvialis* e PSS422 foi 98,1% com *V. atypicus*. Pelos resultados obtidos por meio de MLSA, foi possível identificar onze espécies de vibrios, sendo *Vibrio fluvialis* (n=30) e *Vibrio alginolyticus* (n=24) as mais abundantes (Figura 22), seguidas de *V. campbellii* (n=8), *V. rotiferianus* (n=5), *V. harveyi* (n=4), *V. diabolicus* (n=2), *V. atypicus* (n=1), *V. coralliilyticus* (n=1), *V. maritimus* (n=1), *V. parahaemolyticus* (n=1) e *V. tubiashii* (n=1) (Figura 22).

Na Baixada Santista (Figura 20), área com atividade antrópica evidente, com 37 isolados, a partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05,* o isolado PF689-1 apresentou 99,6% de similaridade com *Vibrio fortis*, PF639 de 99,3% com *V. natriegens,* PF167 de 95,2% com *V. navarrensis* e o isolado PF697 foi 95,1% similar com *V. fluvialis.* Os isolados PF689-2 e PF689-3 foram 100% similares entre si e 99,3% com *V. maritimus,* e, a similaridade de PF687 e PF688 foi de 99,3% entre si e de 99,1% e 98,5% com *V. communis*, respectivamente. PF462, PF657 e PF662 foram 98,4%, 98,2% e 98,8% similares com *V. harveyi,* respectivamente. Os isolados PF664-1 e PF664-2 foram 100% similares entre si e 98,9% com *V. rotiferianus*, e PF383 e PF643 foram 98,4%, e 98,0%, respectivamente. Identificaram-se, por meio de MLSA, 11 espécies de vibrios: *Vibrio alginolyticus* (n=11), *V. parahaemolyticus* (n=8), *V. rotiferianus* (n=4), *V. campbellii* (n=3), *V. harveyi* (n=3), *V. communis* (n=2), *V. maritimus* (n=2), *V. fluvialis* (n=1), *V. fortis* (n=1), *V. natriegens* (n=1) e *V. navarrensis* (n=1) (Figura 22).

Dos isolados provenientes de Ubatuba (Figura 19), um ambiente aquático de áreas com atividade antrópica mínima, a partir da matriz de similaridade do programa *Mega 5.05,* os isolados PF51, PF61, PF62, PF66 e PF68 apresentaram 100% de similaridade e foram identificados como *V. fluvialis* com 99,3%. A similaridade do isolado PF53 foi de 99,6% com *V. campbellii* e de 98,4% nos isolados PF597 e PF611. Os isolados PF599 e PF601 foram 99,8% similares entre si e 99,1% e 99,2% com o *V. harveyi,* respectivamente. Os isolados PF263, PF267, PF294, PF297, PF604, PF614 e PF617 apresentaram similaridade de 98,9% a 99,8% com *V. alginolyticus*. Desta forma, pelos resultados obtidos com MLSA, foi possível identificar quatro espécies de vibrios (Figura 21) sendo elas, *V. alginolyticus* (n=7), *V. fluvialis* (n=5), *V. campbellii* (n=3) e *V. harveyi* (n=2) (Figura 22 e Figura 23). Verificou-se uma maior diversidade de vibrios nas amostras coletadas da água do mar, com 4 espécies: *Vibrio alginolyticus* (n=2), *V. harveyi* (n=2), *V. campbellii* (n=2) e *V. fluvialis* (n=1). Nas amostras coletadas de bivalves, foram encontradas as espécies *Vibrio alginolyticus* (n=4) e *V. campbellii* (n=1) e, nas de plâncton, *V. fluvialis* (n=4) e *V. alginolyticus* (n=1). *Vibrio harveyi* foi encontrada apenas em amostras de água do mar.

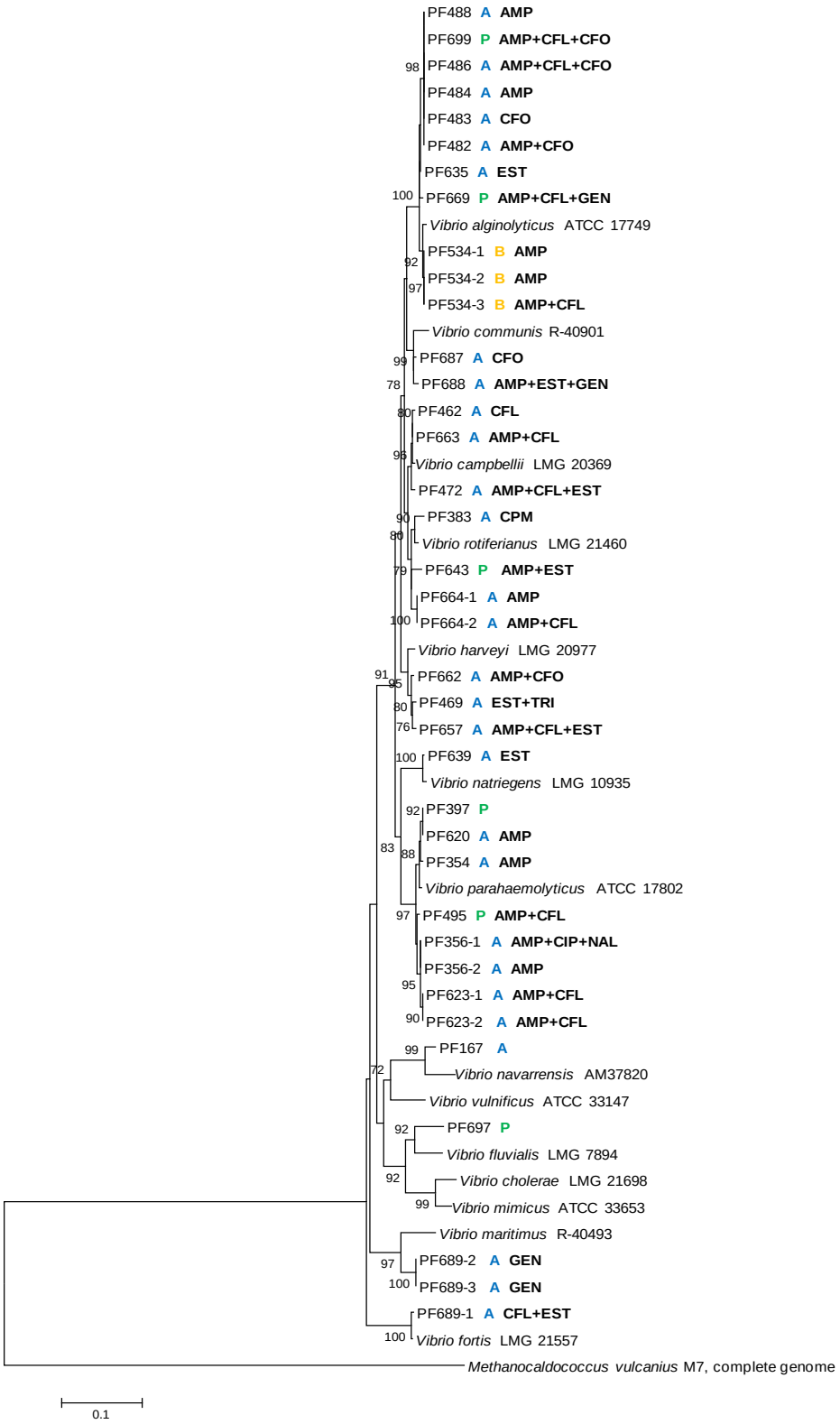
As espécies *V. atypicus, V. coralliilyticus,* e *V. tubiashii* foram encontradas apenas em amostras de água do mar e *V. diabolicus* em amostras de bivalves do Canal de São Sebastião, enquanto *V. communis, V. fortis, V. natriegens* e *V. navarrensis* foram encontradas em amostras de água do mar da Baixada Santista. *Vibrio parahaemolyticus, V. maritimus* e *V. rotiferianus* foram encontradas no Canal de São Sebastião e na Baixada Santista. *Vibrio alginolyticus, V. harveyi, V. campbellii* e *V. fluvialis* foram comuns aos três locais de coleta (Figura 23).

Figura 19- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos genes *pyr*H, *rec*A e *rpo*A dos isolados do Canal de São Sebastião com as sequências disponíveis no NCBI.



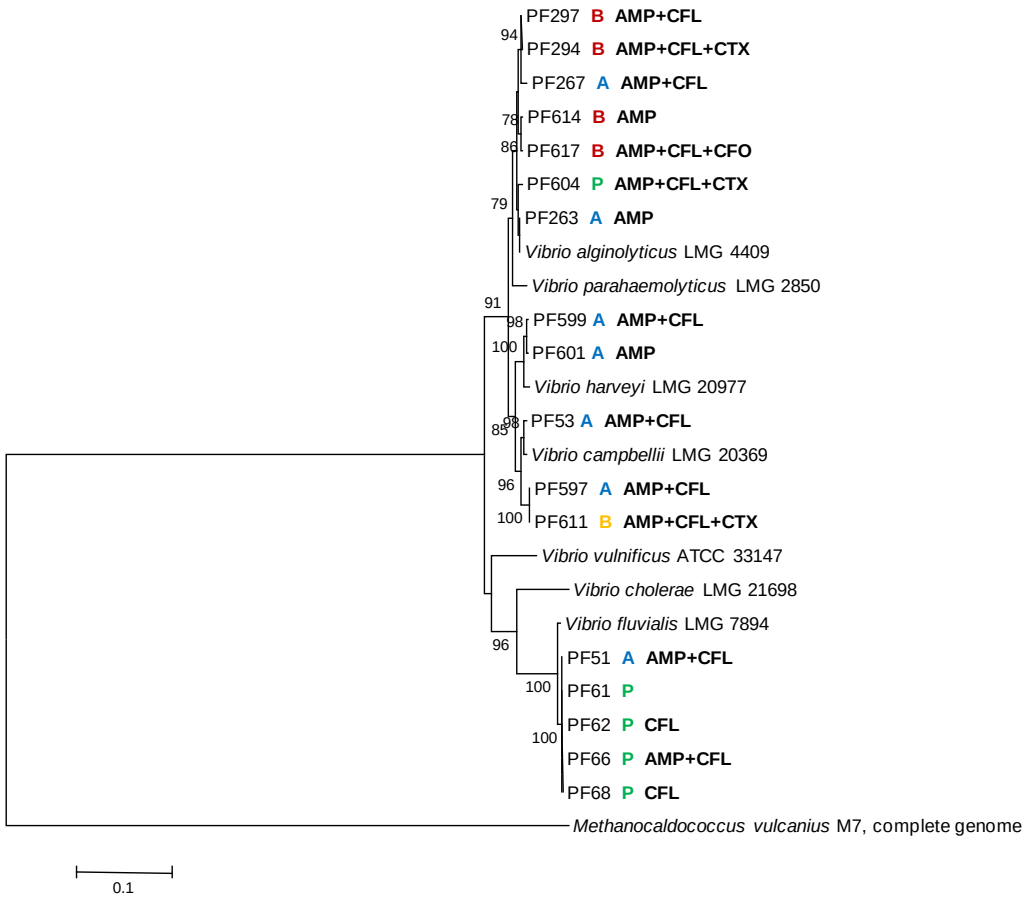
Nota: Bootstrap <70 foram removidos da figura. A, água do mar; P, plâncton; B, bivalve. Resistência aos antibióticos: AMP, ampicilina; CFO, cefoxitina; CFL, cefalotina; CLO, cloranfenicol; CPM, cefepima; CTX, cefotaxima; EST, estreptomicina; GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; TRI, trimetoprima.

Figura 20- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos genes *pyr*H, *rec*A e *rpo*A dos isolados da Baixada Santista com as sequências disponíveis no NCBI.



Nota: Bootstrap <70 foram removidos da figura. A, água do mar; P, plâncton; B, bivalve. Resistência aos antibióticos: AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; CFO, cefoxitina; CFL, cefalotina; EST, estreptomicina; GEN, gentamicina; NAL, ácido nalidíxico.

Figura 21- Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos genes *pyr*H, *rec*A e *rpo*A dos isolados de Ubatuba com as sequências disponíveis no NCBI.



Nota: Bootstrap <70 foram removidos da figura. A, água do mar; P, plâncton; B, bivalve. Resistência aos antibióticos: AMP, ampicilina; CFO, cefoxitina; CTX, cefotaxima; CFL, cefalotina.

Figura 22 - Abundância das espécies de vibrios por local de coleta - Ubatuba, Baixada Santista e Canal de São Sebastião.

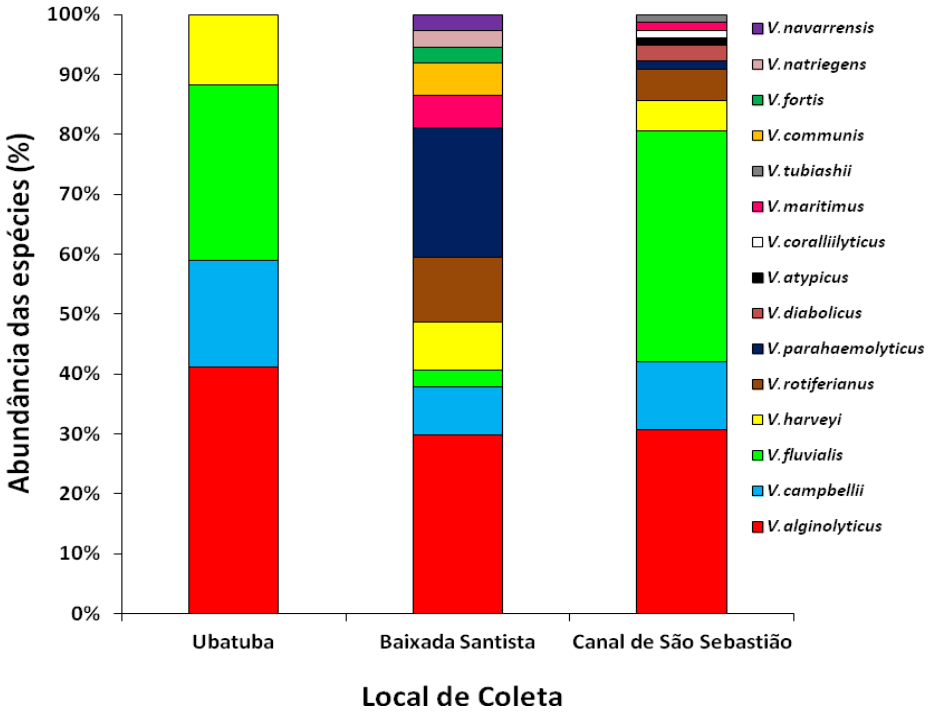
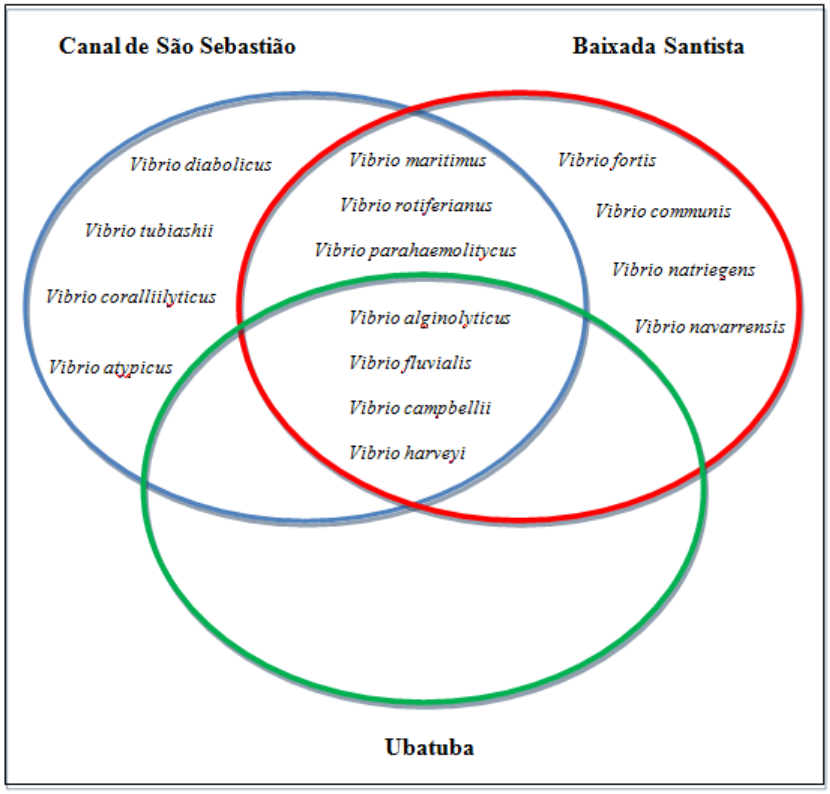


Figura 23 – Distribuição das espécies de vibrios por local de coleta - Ubatuba, Baixada Santista e Canal de São Sebastião.



6 DISCUSSÃO

6.1 Isolamento e identificação bioquímica

Neste estudo, os isolados de vibrios foram submetidos ao re-isolamento nos meios de cultura TCBS (OXOID) e CHROMagar Vibrio (PROBAC). Apesar do meio TCBS ter sido originalmente desenvolvido para o isolamento de *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*, outras espécies são capazes de crescer neste meio. A morfologia da colônia varia de acordo com a espécie. *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, por serem sacarose negativos, formam colônias de coloração verde, enquanto *Vibrio cholerae*, *V. fluvialis* e *V. alginolyticus* formam colônias amarelas por serem sacarose positivos (KOBAYASHI et al., 1963; NAKANISHI, 1963). O CHROMagar Vibrio permite o isolamento de vibrios, distinguindo as espécies pela coloração de suas colônias. *Vibrio vulnificus* e *V. cholerae* formam colônias de cor verde azulada a azul turquesa, *V. parahaemolyticus* crescem na cor malva e *V. alginolyticus* na cor branca ou incolor. Este meio tem sido recomendado pela *U.S. Food and Drug Administration* para ser usado, principalmente, em análises de microbiologia de alimentos (DEPAOLA; KAYSNER, 2004).

Para a identificação bioquímica, foi utilizado o *kit* comercial API 20E. Por meio dos seus 21 testes, foi possível identificar 112 (84,8%) isolados como pertencentes ao gênero *Vibrio*. Esse sistema padronizado permite identificar somente seis espécies: *V. cholerae, V. alginolyticus, V. fluvialis, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* e *V. mimicus*. No entanto, pelo resultado das provas fenotípicas, o API 20E poderá auxiliar como teste presuntivo e de base para complementar a caracterização dos vibrios no ecossistema marinho.

Biosca e colaboradores (1993) analisaram cepas de *V. vulnificus* pelo Sistema de Identificação Bioquímica API 20E e observaram algumas reações falsas positivas, principalmente no teste do citrato. O mesmo foi notado por Santos et al., (1993), que além de reações falsas negativas, verificaram que 66% dos isolados de *V. anguillarum* foram identificados como *Aeromonas hydrophila*. Nos trabalhos de Lee et al. (2008), *V. fluvialis* foi identificado como *A. hydrophila*. Outro estudo concluiu que testes adicionais ao API 20E, tais como morfológicos, fisiológicos e moleculares, são necessários para complementar a identificação de vibrios (JUANG; MORGAN, 2001).

Como o API 20E foi originalmente desenvolvido para a identificação de membros da família *Enterobacteriaceae*, poucos membros da família *Vibrionaceae* foram incluídos no seu sistema de dados, tornando-se limitado para a identificação bacteriana (BIOSCA et al., 1993), principalmente

quando aplicado em isolados ambientais. E, embora seu uso seja fácil e rápido, é necessário que ele seja realizado em paralelo com métodos moleculares como PCR para confirmar os dados e/ou excluir uma identificação errônea (DIPINTO et al., 2011).

6.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Os ambientes naturais representam reservatórios de genes de resistência aos antibióticos, de forma que mudanças nestes ecossistemas podem ser relevantes para a seleção de bactérias patogênicas resistentes. Mais ainda, alterações antropogênicas em ambientes naturais podem colaborar com o incremento da população de bactérias resistentes, facilitando a transferência desses genes (CHYTHANYA et al., 1999; COSTA et al., 2008; GHOSH; RAMAMURTHY, 2011; MANDAL et al., 2012; MARTÍNEZ, 2008).

Segundo Miller et al. (2009), em ambientes menos contaminados por efluentes de esgoto ou em ambientes pristinos, é normal encontrar baixa resistência bacteriana aos antibióticos. Essa característica foi encontrada nos isolados deste estudo, ao verificarmos que, nos isolados de Ubatuba, dos onze antibióticos testados, observou-se resistência a apenas quatro deles, principalmente para a ampicilina (82,3%) e para a cefalotina (76,4%). Em contrapartida, nos ambientes caracterizados por maior contaminação fecal, Baixada Santista (alto impacto antropogênico) e Canal de São Sebastião (médio impacto antopogênico) (BURBANO-ROSERO et al., 2011), observou-se resistência a 10 e a 9 antibióticos, respectivamente, dos 13 empregados, com predominância de isolados resistentes à ampicilina e à cefalotina.

A elevada frequência de isolados resistentes à ampicilina (62,4%) e à cefalotina (52,6%), bem como a sensibilidade à ciprofloxaxina (100%), ao meropenem (100%), ao ácido nalidíxico (99,2%), à tetraciclina (99,2%), e ao cloranfenicol (97,7%), obtidas em nosso estudo, é semelhante com a encontrada em trabalhos feitos por Mayer (2010) com isolados de *Vibrio fluvialis*, os quais foram 100% susceptíveis ao cloranfenicol, meropenem e ciprofloxaxina, e resistentes à ampicilina (61,5%) e à cefalotina (76,9%); e por Ferrini et al. (2008), que reportaram 100% de susceptibilidade ao cloranfenicol e a resistência à ampicilina de 82% em isolados provenientes de água e frutos do mar.

Manjusha e colaboradores (2005) encontraram 100% de resistência à ampicilina em vibrios isolados de camarões cultivados na Índia, bem como 100% de sensibilidade a cloranfenicol, 93,7% à gentamicina, 87,5% ao ácido nalidíxico e de 68,7% à tetraciclina. Nos trabalhos realizados por Roque et al. (2001), a resistência à ampicilina foi de 68% em *Vibrio* spp. isolados de camarões. Vieira e colaboradores (2000) evidenciaram estirpes de *V. alginolyticus* e *Vibrio* spp. isoladas de larvicultura

de camarão marinho, apresentando resistência a sulfonamidas e penicilina, eritromicina, tetraciclina e ciprofloxacina, respectivamente.

Além disso, foi documentada alta resistência aos antibióticos (80 a 100%) em *Vibrio cholerae* O1 em regiões endêmicas de cólera na África (OKEKE et al., 2007), principalmente em Moçambique (MANDOMANDO et al., 2007), e em Calcutá, na Índia (ROYCHOUWDHURY et al., 2008). Alguns estudos relatam que o padrão de resistência do *V. cholerae* não é uniforme, sendo dependente da fonte e localização geográfica do isolado (DALSGAARD et al., 2000; KERAMAT et al., 2008). Também foi demonstrado que a maioria dos isolados de vibrios, independentemente da espécie, são susceptíveis à tetraciclina, à gentamicina, ao ácido nalidíxico e ao cloranfenicol. A resistência à ampicilina, penicilina e outras cefalosporinas também foram reportadas, porém relacionadas a algumas espécies ou grupos (CLARK, 1992; FRENCH et al., 1989; JANDA, 1998).

A ampicilina e a cefalotina pertencem à classe dos beta-lactâmicos, antibióticos preferencialmente utilizados no tratamento de doenças infecciosas, cuja hidrólise pelas enzimas beta-lactamases é o mecanismo de resistência mais comum em bactérias gram-negativas (BUSH; JACOB, 2010). Para cepas de *V. cholerae* O1, também foram propostos, por Nguyen e colaboradores (2009), dois mecanismos para a resistência à ampicilina independentes dessa ação enzimática, ambos envolvendo alteração da permeabilidade celular, tanto em cepas rugosas quanto nas cepas fimbriadas.

No presente estudo, foi observada uma alta porcentagem de múltipla resistência aos antibióticos empregados (64,7% em Ubatuba, 48,6% na Baixada Santista e 43,6% no Canal de São Sebastião), fato que aponta para o perigo da presença dessas bactérias nas áreas estudadas. Desta forma, a investigação da susceptibilidade aos antimicrobianos em ecossistemas aquáticos é de grande importância, pois a presença de bactérias resistentes nesses ambientes oferece perigo quanto à sua disseminação, constituindo um problema de saúde pública.

6.3 Genes associados à virulência

A transferência horizontal de genes e o processo de recombinação genética têm permitido o surgimento, no ambiente marinho, de espécies de *Vibrio* patogênicas a partir espécies não patogênicas (FARUQUE; NAIR, 2006; WANG et al., 2006), visto que já foi relatado que o ambiente aquático serve como um reservatório de genes (ZO et al., 2002). Sendo assim, o consumo de frutos do mar crus ou mal cozidos, e/ou água contaminada ou exposição de feridas abertas a água contaminada são as causas mais comuns de infecções por vibrios (FARMER III; JANDA, 2005).

Já foi relatado que isolados ambientais de espécies de *Vibrio* podem atuar como reservatórios para potencial disseminação de genes de virulência no ambiente natural (WANG et al., 2006), uma vez que, devido à alta similaridade da composição genética, existe uma alta probabilidade de que eles incorporem genes responsáveis pela patogenicidade, através de plasmídeos, ilhas de patogenicidade, bacteriófagos e integrons, carregando, assim, diferentes combinações de genes de virulência (CHIANG; MEKALANOS, 1999).

Neste trabalho, foram analisados os principais genes associados à virulência, *ctxA*, *tcpA*, *tdh*, *trh* e *stn/sto*, que codificam a toxina colérica (CT), a toxina correguladora do pilus (TCP), a hemolisina termoestável direta (TDH), a hemolisina termoestável relativa (TRH) e a enterotoxina termoestável de *Vibrio cholerae* não aglutinável (NAG), respectivamente. E, embora esses genes sejam encontrados em *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, estudos já relataram sua presença em outras espécies (KARAOLIS et al., 1998; RIVERA et al., 2001; SECHI et al., 2000), evidenciando que os genes de virulência podem circular entre as diferentes espécies de *Vibrio*.

Dos 132 isolados analisados, quatro (3,0%) isolados de água do mar proveniente da Baixada Santista foram positivos para *stn/sto*, sendo três (PF620, PF623-1 e PF623-2) da espécie *Vibrio parahaemolyticus* e um (PF482) *Vibrio alginolyticus*. Este gene também foi detectado, por Yuan et al. (1994), em *Vibrio mimicus*.

A enterotoxina termoestável de *Vibrio cholerae* não-O1 (NAG) exibe 50% de similaridade com enterotoxinas termoestáveis produzidas por *Escherichia coli* toxigênica do homem (STh) e do porco (STp) (ARITA et al., 1991; OGAWA et al., 1990), apresenta-se raramente em cepas epidêmicas (TAKEDA et al., 1991) e a frequência em cepas não epidêmicas isoladas do meio ambiente é relativamente baixa (PAL et al., 1992). Além disso, foi demonstrado por Vicente et al. (1997) que cepas não epidêmicas produtoras desta toxina podem provocar diarreia severa semelhante à cólera.

Tem sido reportado que isolados de *V. cholerae* de origem ambiental carregam um ou mais genes associados à virulência em baixa frequência (BAG et al., 2008; FARUQUE et al., 2004; RIVERA et al., 2001). A presença dos genes *ctxA* e *tcpA* é característica de isolados pandêmicos, de clones O1 toxigênicos, no entanto, cepas não-O1/não-O139 podem carregar um ou ambos os genes. Além disso, isolados de eventos esporádicos de cólera podem carregar os genes da toxina colérica (BHOWMICK et al., 2009; JAGADEESHAN et al., 2009; LEE et al., 2007) e da enterotoxina termoestável de *Vibrio cholerae* não-O1 (NAG), o que pode contribuir para a virulência (ARITA et al., 1986; OGAWA et al., 1990).

6.4 Caracterização molecular utilizando MLSA

A classificação e identificação de *Vibrio*, tradicionalmente, são realizadas utilizando os métodos clássicos de caracterização, que têm por base a morfologia e as características bioquímicas. Entretanto, este gênero apresenta uma elevada diversidade bioquímica, dificultando a sua identificação fenotípica (THOMPSON et al., 2004b). Com a proposta de uma taxonomia polifásica, Colwell et al., (1970) promoveram a integração da informação do nível molecular ao ecológico para se obterem identificações mais precisas. Em 1987, Carl Woese demonstrou que o estudo do gene do RNA ribossomal 16S era capaz de esclarecer as relações filogenéticas baseando-se na comparação das sequências de 1500 nucleotídios. As sequências do gene 16S rRNA são consideradas como importantes marcadores moleculares porque estão presentes em todos os organismos, são conservadas estrutural e funcionalmente, apresentando domínios altamente conservados ao longo da evolução (AMANN; LUDWIG, 2000; WOESE, 1987).

No entanto, o gênero *Vibrio* apresenta alta similaridade do gene 16S rRNA entre as espécies. Nos membros do "*Vibrio core group"* a similaridade é de ≥ 97,6% (CANO-GOMEZ et al., 2011; DORSCH et al., 1992; URAKAWA et al., 1997), em *V. fortis* e *V. pelagius* é de 98,8%, e em *V. neptunius, V. brasiliensis* e *V. xuii,* a similaridade do gene 16S rRNA é de 99% (THOMPSON et al., 2003; THOMPSON et al., 2004a).

A partir de 2005, diversos trabalhos demonstraram o sucesso da metodologia MLSA na taxonomia de vibrios com base em dados obtidos de múltiplas sequências de genes (NASER et al., 2005; SAWABE et al., 2007; THOMPSON et al., 2005, 2007, 2008). Thompson e colaboradores (2005) analisaram as sequências dos genes *pyrH*, *recA* e *rpoA* em isolados da família *Vibrionaceae* e sugeriram que a metodologia MLSA poderia ser usada para uma rápida detecção e identificação de vibrios patogênicos do ambiente, e com o uso dos mesmos genes, foi possível diferenciar *V. cholerae* de *V. mimicus* (Thompson et al., 2008). Com o uso de MLSA, Sawabe e colaboradores (2013) reportaram a espécie *Vibrio tritonius*. *V. porteresiae* foi sugerida como uma nova espécie por Rameshkumar et al. (2008) com base na sequência concatenada dos genes 16S rRNA, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, e *nifH*. Já, Pascual et al. (2010) examinaram a diferenciação dos membros do *Vibrio core group* usando os genes 16S rRNA, *recA, pyrH, rpoD, gyrB, rctB* e *toxR*.

As espécies de *V. harveyi* e *V. campbellii* têm sido geneticamente relatadas como espécies que apresentam uma alta similaridade no DNA (69%) e rRNA (97%) (GOMEZ-GIL et al., 2003). O gene *recA*, avaliado por Thompson et al. (2004a), mostrou que *V. harveyi, V. campbellii* e *V. rotiferianus* apresentam 97% de similaridade (>98% pelo gene 16S rRNA), e a similaridade de 90% em *V.*

neptunius, V. brasiliensis e *V. xuii* (99% pelo gene 16S rRNA). Já, o gene *pyrH* foi capaz de diferenciar satisfatoriamente *V. campbellii* de *V. harveyi*, enquanto os genes *recA* e *gyrB* não proporcionam essa diferenciação (THOMPSON et al., 2007). Pascual et al. (2010) também citam uma baixa resolução dos genes *recA* e *gyr*B no *Vibrio core group* e ainda acreditam que o gene *pyrH* é incapaz de diferenciar *V. campbellii* de *V. rotiferianus.*

Os genes *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD* têm sido reportados como excelentes marcadores filogenéticos na identificação de vibrios, porém, dependendo do grupo que está sendo analisado, diferentes genes mostram diferentes graus de discriminação. Conforme descrito na literatura, usando estes genes, não foi possível diferenciar perfeitamente *V. neptunius* de *V. coralliilyticus*, e, *V. anguillarum* de *V. ordalii* (THOMPSON et al., 2005). Também no nosso estudo, os genes *recA* e *rpoD* não diferenciaram *V. harveyi* de *V. campbellii* nos isolados de Ubatuba, bem como, o *recA* não diferenciou *V. campbellii* e *V. communis* no isolado PF643 da Baixada Santista, sendo, portanto, as informações obtidas pelo MLSA essenciais para a precisão na identificação das espécies.

Neste estudo, as análises filogenéticas foram realizadas com as sequências individuais dos genes *pyrH, recA, rpoA* e *rpoD*, porém a filogenia obtida por meio do estudo de um único gene não pode ser considerada para representar a filogenia das espécies de vibrios estudadas, uma vez que nenhum gene é completamente resistente à transferência horizontal, ou às mutações (GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007; THOMPSON et al., 2004b). Além disso, foram realizadas análises, também, pela técnica de MLSA, baseada na sequência concatenada do genes *pyrH, recA* e r*poA*, sendo possível identificar quinze espécies de vibrios isoladas de amostras de água do mar, plâncton e bivalves da zona litorânea do Estado de São Paulo. Apesar de o gene *rpoD* ter sido utilizado em vários trabalhos envolvendo vibrios (HOFFMANN et al., 2011a; PASCUAL et al., 2010; TARAZONA et al., 2015; WANG et al., 2015), este gene foi retirado das sequências concatenadas, pois possui uma reduzida base de dados, o que dificultou as análises dos isolados com as sequências de referência utilizadas para os demais genes estudados.

Em Ubatuba, um ambiente aquático proveniente de áreas com atividade antrópica mínima, quatro espécies de vibrios foram identificadas, sendo elas, *Vibrio alginolyticus* (n=7), *V. fluvialis* (n=5), *V. campbellii* (n=3) e *V. harveyi* (n=2). No Canal de São Sebastião, área com moderado impacto humano, identificaram-se onze espécies de vibrios: *Vibrio fluvialis* (n=30), *V. alginolyticus* (n=24), *V. campbellii* (n=8), *V. rotiferianus* (n=5), *V. harveyi* (n=4), *V. diabolicus* (n=2), *V. atypicus* (n=1), *V. coralliilyticus* (n=1), *V. maritimus* (n=1), *V. parahaemolyticus* (n=1) e *V. tubiashii* (n=1). E, na Baixada Santista, área com atividade antrópica evidente, as onze espécies evidenciadas foram: *Vibrio alginolyticus* (n=11), *V. parahaemolyticus* (n=8), *V. rotiferianus* (n=4), *V. campbellii* (n=3),

V. harveyi (n=3), *V. communis* (n=2), *V. maritimus* (n=2), *V. fluvialis* (n=1), *V. fortis* (n=1), *V. natriegens* (n=1) e *V. navarrensis* (n=1).

Além disso, pode-se observar a mesma quantidade de espécies de vibrios na Baixada Santista e no Canal de São Sebastião, com a identificação de onze espécies em cada local. Como as bactérias do gênero *Vibrio* são autóctones do ambiente marinho e por serem heterotróficos obrigatórios, elas utilizam uma ampla variedade de fontes de carbono para obter energia, exercem um papel essencial no ciclo de nutrientes, degradando a matéria orgânica e disponibilizando-a para outros organismos (SHERR et al., 2002; THOMPSON; POLZ, 2006).

No trabalho realizado por Burbano-Rosero et al. (2011), com pontos de coleta em São Sebastião, Baixada Santista e em Ubatuba, observou-se uma maior diversidade de colifagos na Baixada Santista, e este fato foi atribuído à presença de uma grande quantidade de matéria orgânica na água do mar, que, por ser uma mistura complexa de compostos orgânicos com diferente composição química e estruturas físicas e, juntamente com a variável de abastecimento de regimes de chuvas, é um dos principais fatores que ajudam a manter uma elevada diversidade de comunidades nos oceanos (NAGATA, 2008; BURBANO-ROSERO et al., 2011).

Já, em estudos realizados por Souza-Sales (2009), nos mesmos pontos de coleta, a maior diversidade de gêneros de bactérias quitinolíticas foi encontrada em amostras de água do mar coletadas no Canal de São Sebastião e em amostras de plâncton coletadas em Ubatuba. Por outro lado, nas amostras de água do mar coletadas na Baixada Santista, foi verificada a menor diversidade de gêneros bacterianos. Contudo, neste ambiente com alta atividade antropogênica, foram obtidos os isolados com maior potencial de degradação de quitina (SOUZA-SALES, 2009). Segundo Colwell (1997), os ecossistemas aquáticos possuem em sua composição micro-organismos autóctones que exercem uma função específica e micro-organismos alóctones, que frequentemente provêm de atividades antropogênicas. Essas atividades, direta ou indiretamente, têm provocado mudanças irreversíveis na biodiversidade microbiana dos ecossistemas aquáticos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Neste estudo, os isolados de *Vibrio* spp. apresentaram sensibilidade ao ácido nalidíxico, à ciprofloxaxina, ao cloranfenicol, ao meropenem e à tetraciclina e resistência à ampicilina e à cefalotina, além de uma alta porcentagem de múltipla resistência aos antimicrobianos: 64,7% em Ubatuba, 48,6% na Baixada Santista e 43% no Canal de São Sebastião.

- Em nossos isolados não foram encontrados vibrios potencialmente patogênicos.

- Há uma reduzida base de dados para o gene *rpoD*, o que dificultou as análises dos isolados com as sequências de referências.

- Utilizando os genes *housekeeping* nas análises filogenéticas, os isolados foram identificados ao nível de espécie, apresentando, em alguns casos, divergências nas espécies membros do "*Vibrio core group"*.

- Pelos resultados obtidos com MLSA, utilizando os genes *pyrH*, *recA* e *rpoA*, foi possível identificar quatro espécies de vibrios em Ubatuba, um ambiente aquático com atividade antrópica mínima (*Vibrio alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. campbellii* e *V. harveyi)*; onze espécies de vibrios no Canal de São Sebastião, área com moderado impacto humano (*Vibrio fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. harveyi*, *V. diabolicus*, *V. atypicus*, *V. coralliilyticus*, *V. maritimus*, *V. parahaemolyticus* e *V. tubiashii*); e, onze espécies na Baixada Santista, área com alta atividade antrópica (*Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. communis*, *V. maritimus*, *V. fluvialis*, *V. fortis*, *V. natriegens* e *V. navarrensis*).

REFERÊNCIAS [1]

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. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 875-885, 2005.

AL-OTHRUBI, S. M.; KQUEEN, C. Y.; MIRHOSSEINI, H.; HADI, Y. A.; RADU, S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles and shrimp sea food marketed in Selangor, Malaysia. **Clinical Microbiology**, v. 3; p. 1-7, 2014.

ALMEIDA, B. C. **Diversidade de bactérias em amostras de água do mar no canal de São Sebastião.** 2009 198 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

AMANN, R.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 555-656, 2000.

ARITA, M.; TAKEDA, T.; HONDA, T. T. Purification and characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 heat-stable enterotoxin. **Infection and Immunity**, v. 52, p. 45-49, 1986.

ARITA, M.; HONDA, T.; TOSHIO, M.; OHMORI, K.; TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y. Purification and characterization of a new heat-stable enterotoxin produced by *Vibrio cholerae* Non-O1 serogroup Hakata. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 2186-2188, 1991.

AUSTIN, B.; PRIDE, A. C.; RHODIE, A. G. Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. **Journal Fish Disease,** v. 26, p. 55-58, 2003.

AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 310–317, 2010.

BAG, P. K.; BHOWMIK, P.; HAJARA, T. K.; RAMAMURTHY, T.; SARKAR, P. Putative virulence traits and pathogenicity of *Vibrio cholerae* Non-O1, Non-O139 isolates from surface waters in Kolkata, India. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 74, p. 5635-5644, 2008.

BALEBONA, M. C.; ANDREU, M. J.; BORDAS, M. A.; ZORRILLA, I.; MORIÑIGO, M. A.; BORREGO, J. J. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for Cultured Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4269–4275, 1998.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. Agentes Antimicrobianos. In: BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B.; FURLANETO, M. C. **Microbiologia básica**. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 157-173.

[1]* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências:elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BENSON, H. J. Antimicrobial sensitivity testing: the Kirby-Bauer method. In: BENSON, H. J. **Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology.** Boston: McGraw Hill, 1998. p. 139–141.

BHOWMICK, T. S.; DAS, M.; RUPPITSCH, W.; STOEGER, A.; PIETZKA, A. T. Detection of virulence-associated and regulatory protein genes in association with phage typing of human *Vibrio cholera*e from several geographical regions of the world. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1160-1167, 2009.

BIOSCA E. G.; ESTEVE C.; GRAY E.; AMARO, C. Evaluation of the API 20E system for identification and discrimination of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2. **Journal Fish Disease**, v. 16, p. 79–82, 1993.

BRAGA, E. S.; MULLER, T. J. Observation of regeneration of nitrate, phosphate and silicate during upwelling off Ubatuba, Brazil, 23ºS. **Continental Shelf Research**, 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.

BRUNDTLAND, G. H. Vencendo a resistência microbiana. 2000. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/vencendoresistencia.html>. Acesso em: 10 out. 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BURBANO-ROSERO, E. M.; UEDA-ITO, M.; KISIELIUS, J. J.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; ALMEIDA, B. C.; SOUZA, C. P.; MARKMAN, C.; MARTINS, G. G.; ALBERTINI, L.; RIVERA, I. N. G. Diversity of Somatic Coliphages in Coastal Regions with Different Levels of Anthropogenic Activity in São Paulo State, Brazil. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4208-4216, 2011.

CALIMAN, A. **Biodiversidade de macroinvertebrados bentônicos e funcionamento de ecossistemas aquáticos: uma abordagem experimental.** 2005. 96 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Ecologia, UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

CANO-GOMEZ, A.; HOJ, L.; OWENS, L.; ANDREAKIS, N. Multilocus sequence analysis provides basis for fast and reliable identification of *Vibrio harveyi*-related species and reveals previous misidentification of important marine pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 561-565, 2011.

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.

CEFAR. Resistência bacteriana. **Cefar em notícia: Informativo Cefar de Microbiologia**. Ano III, Ed. 19, jan./fev. 2006.

CHAKRABORTY, S. S.; MUKHOPADHYAY, A. K.; ASAKURA, M.; YAMASAKI, S.; BHATTACHARYA, S. K.; NAIR, G. B.; RAMAMURTHY, T. Species-specific identification of *Vibrio fluvialis* by PCR target to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of the *tox*R gene. **Journal of Medical Microbiology**, p. 805-808, 2006.

CHAPIN, F. S.; WALKER, B. H.; HOBBS, R. J.; HOOPER, D. U.; LAWTON, J. H.; SALA, O. E.; TILMAN, D. Biotic control over the functioning of ecosystems. **Science**, v. 277, p. 500-504, 1997.

CHIANG, S. L.; MEKALANOS, J. 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,1999. p. 156–169.

CHIAVELLI, D. A., MARSH, J. W., TAYLOR, R. K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 67, p. 3220-3225, 2001.

CHIEN, J. Y.; SHIH, J. T.; HSUEH, P. R.; YANG, P. C.; LUH, K. T. *Vibrio alginolyticus* as the cause of pleural empyema and bacteremia in an immunocompromised patient. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 21, n. 5, p. 401-403, 2002.

CHUN, J. **Computer assisted classification and identification of *Actinomycetes***. 444 f. Ph.D. Thesis - University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, England, 1995.

CHUN, J., RIVERA, I. N. G., COLWELL, R. R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* for detection of these species. **Methods in Molecular Biology**, v. 179, p. 171-178, 2001.

CHYTHANYA, R.; NAYAK, D. K.; VENUGOPAL, M. N. Antibiotic resistance in aquaculture. **Aquaculture**, v. 6, p. 30-32, 1999.

CLARK, R. B. Antibiotic susceptibilities of the *Vibrionaceae* to meropenem and other antimicrobial agents. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 15, p. 453-455, 1992.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; 19th International Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S19.Wayne, 2009.

COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, v. 104, n. 1, p. 410 – 433, 1970.

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

COLWELL, R. R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 302-307, 1997.

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

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relatório de balneabilidade das praias Paulistas. São Paulo: CETESB, 2004. 331 p.

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

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, G. C.; VIEIRA, R. H. S. F.; SAMPAIO, S. S. Susceptibilidade "in vitro" a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008.

DALSGAARD, A. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aquaculture. **International Journal of Food Science &Technology**, v. 33, p. 127–138, 1998.

DALSGAARD, A.; FORSLUND, A.; PETERSEN, A.; BROWN, D. J.; DIAS, F.; MONTEIRO, S.; MOLBAK, K.; AABY, P.; RODRIGUES, A.; SANDSTROM, A. Class 1 integronborne, multiple-antibiotic resistance encoded by a 150-kilobase conjugative plasmid in epidemic *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Guinea- Bissau. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3774–3779, 2000.

DALMASSO, A.; LANEVE, E.; CROCI, L.; SERRACCA, L.; BOTTERO, M.T.; CIVERA, T. Development of a PCR assay targeting the rpo*A* gene for the screening of *Vibrio* genus. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 4, p. 317-324, 2009.

DAVIS, B. M., WALDOR, M. K. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae.* **Current Opinion in Microbiology,** v. 6, p. 35-42, 2003.

DEPAOLA, A., CAPERS, G. M., ALEXANDER, D. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf coast. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 60, p. 984-988, 1994.

DEPAOLA, A.; KAYSNER, C. A. *Vibrio*. In. *Bacteriological Analytical Manual*, Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.cfasan.fda.gov/~ebam/bam-9.htm>. Acesso em: 15 de janeiro de 2011.

DIEGUEZ, A. L.; BEAZ-HIDALGO, R.; CLEENWERCK, I.; BALBOA, S.; VOS, P.; ROMALDE, J. L. *Vibrio atlanticus* sp. nov. and *Vibrio artabrorum* sp. nov., isolated from the clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61 p. 2406- 2411, 2011.

DIGGLES, B. K.; CARSON, J.; HINE, P. M.; HICKMAN, R. W.; TAIT, M. J. *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand. **Aquaculture**, v. 183, p. 1-12, 2000.

DIPINTO, A.; TERIO, V.; NOVELLO, L.; TANTILLO, G. Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar Vibrio for isolating *Vibrio parahaemolyticus.* **Food Control**, v. 22, p. 124-127, 2011.

DORSCH, M.; LANE, D.; STACKEBRANDT, E. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 42, p. 58–63, 1992.

DUMONTET, S.; KROVACEK, K.; SVENSON, S. B.; PASQUALE, V.; BALODA, S. B.; FIGLIUOLO, S. B. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of Southern Italy. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v. 23, n. 1, p. 53-72, 2000.

FARMER III, J. J.; JANDA, J. M. Vibrionales. In: Garrity G.M. Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology. Michigan: Springer. 2005, v. 2, p. 491-546.

FARUQUE, S. M. Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Infection and immunity,** Washington**,** v. 66, n. 8, p. 3752-3757, 1998.

FARUQUE, S. M.; CHOWDHURY, N.; KAMRUZZAMAN, M.; DZIEJMAN, M.; RAHMAN, M. H. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 2123-2128, 2004.

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

FDA – U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual (BAM), 1995. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>. Acesso em: 15 de janeiro de 2011.

FASANO, A.; BAUDRY, B.; PUMPLIN, D. W.; WASSERMAN, S. S.; TALL, B. D.; KETLEY, J. M.; KAPER, J. B. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin which affects intestinal tight junctions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88 p. 5242-5246, 1991.

FERRINI, A. M.; MANNONI, V.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; CROCI, L. Evaluation of antimicrobial resistance in Vibrio strains isolated from imported seafood and Italian aquaculture settings. **Food Analytical Methods**, v. 1, p. 164-170, 2008.

FIELDS, P. I.; POPOVIC, T.; WACHSMUTH, K.; OLSVIK, F. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2118-2121, 1992.

FIGUEIRA, R. C. L.; CUNHA, I. I. L. A contaminação dos oceanos por radionuclídios antropogênicos. **Química Nova**, v. 21, p. 73-77, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hazard characterization for pathogens in food and water: guidelines.** 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/008/a0252e/a0252e00.htm>. Acesso em: 10 out. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters**. 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/008/a0252e/a0252e00.htm>. Acesso em: 10 out. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. In: REPORT OF A JOINT FAO/WHO EXPERT CONSULTATION ON ANTIMICROBIAL USE IN AQUACULTURE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2006, Seoul, Republic of Korea. p.107.

FRANCO, B. D. G. M. Métodos rápidos e automação em microbiologia de alimentos, 2006. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/M_todos_r_pidos_apostila%5B1%5D.pdf>. Acesso em: 28 out 2010.

FRENCH, J. G. L. ; WOO, M. L.; HUI, Y. M.; CHANN, K. Y. Antimicrobial susceptibilities of halophilic vibrios. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 24, p. 183-194, 1989.

FUHRMAN, J. A.; HAGSTRÖM, A. Bacterial and Archeal Community Structure And Its Patterns. In: KIRCHMAN, D.L. (Ed.). **Microbial Ecology of the Oceans**. 2nd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, p. 45-90, 2008.

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.** 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

GAO, Z.; XIAO, J.; WANG, X.; RUAN, L.; CHEN, X.; ZHANG, Y. *Vibrio xiamenensis* sp. nov., a novel cellulase-producing bacterium isolated from mangrove soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1958-1962, 2011.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; DEPEER, Y. V.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005.

GHOSH, A.; RAMAMURTHY, T. Antimicrobials & cholera: are we stranded? **Indian Journal of Medical Research,** v. 133, p. 225-231, 2011.

GOARANT, C.; REYNAUD, Y.; ANSQUER, D.; DECKER, S.D.; SAULNIER, D.; ROUX, F. I. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostrs*) in New Caledonia. **Systematic Applied Microbiology,** v. 29, p. 570-580, 2006.

GOMEZ-GIL, B.; THOMPSOM, F. L.; THOMPSOM, C. C.; SWINGS, J. *Vibrio rotiferianus* sp. nov.,isolated from cultures of the rotifer Brachionus plicatilis. **International Journal of and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 239-243, 2003.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; CHIMETTO, L.; MOREIRA, A. P. B.; THOMPSON, F. L.; LANG, E. *Vibrio alfacsensis* sp. nov., isolated frommarine organisms. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2955-2961, 2012.

GONZÁLEZ, E. N.; CACHICAR, V.; ACEVEDO, C.; RIOSECO, M. L.; VERGARA, J. A.; CABELLO, F.; ROMERO, J.; ESPEJO, R. T. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. **Emerging Infectious Disease**, v. 11, n. 1, p. 129–131, 2005.

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

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

HIRONO, I.; YAMASHITA, M.; AOKI, T. Molecular cloning of chitinase genes from *Vibrio anguillarum* and *V. parahaemolyticus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 6, p. 1175-1178, 1998.

HOFFMANN, M.; MONDAY, S. R.; FISCHER, M.; BROWN, E. W. Genetic and phylogenetic evidence for misidentification of *Vibrio* species within the *Harveyi* clade. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p. 160-165, 2011a.

HOFFMANN, M.; MONDAY, S. R.; ALLARD, M. W.; STRAIN, E. A.;WHITTAKER, P.; NAUM, M.; MCCARTHY, P. J.; LOPEZ, J. V.; FISHER, M.; BROWN, E. W. *Vibrio caribbeanicus* sp. nov., isolated from marine sponge *Scleritoderma cyanea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62 p. 1736-1743, 2011b.

HONDA, T.; IIDA, T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct heamolysin and related heamolysins. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 4, p. 106-113, 1993.

HOSHINO, T.; NAKABAYASHI, T.; HIROTA, K.; MATSUNO, T.; KOIWA, R.; FUJIU, S.; SAITO, I.; TKACHENKO, O. B.; MATSUYAMA, H.; YUMOTO, I. *Paenibacillus macquariensis* subsp. *defensor* subsp. nov., isolated from boreal soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2074–2079, 2009.

HUANG, K.; HSU, R. W. Vibrio fluvialis hemorrhagic cellulitis and cerebritis. **Clinical Infectious Disease**, v. 40, n. 9, p. 75-77, 2005.

HUQ, A; COLWELL, R. R. Vibrios in the marine and estuarine environments. **Journal of Marine Biotechnology**, v. 3, p. 60-63. 1994.

ITOI, S.; KANOMATA, Y.; KOYAMA, Y. ; KADOKURA, K.; UCHIDA, S.; NISHIO, T.; OKU, T.; SUGITA, H. Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain No. 442. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1774, n. 9, p. 1099-1107, 2007.

JAGADEESHAN, S.; KUMAR, P.; ABRAHAM, W. P.; THOMAS, S. Multiresistant *Vibrio cholerae* non-O1/nonO139 from waters in South India: resistance patterns and virulence-associated gene profiles. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 538-544, 2009.

JANDA, J. M. *Vibrio, Aeromonas* and *Plesiomonas.* In Balows A., and Duerden B. I. (eds), Topley and Wilson´sMicrobiology and Microbial Infections, v. 2, 9th ed. London: Arnold, 1998, p. 1065-1089.

JIN, C.; LUO, P.; ZUO, H.; CHEN, J.; CHEN, M.; WANG, W. *Vibrio zhanjiangensis* sp. nov., isolated from sea water of shrimp farming pond. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 743-751, 2012.

JIRAVANISHPAISAL, P.; MIYAZAKI, T.; LIMSUWAN, C. Histopathology, biochemistry and pathogenity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 6, p. 27-35, 1994.

JUANG, D.; MORGAN, J. M. The applicability of the API 20E and API Rapid NFT systems for the identification of bacteria from activated sludge. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 1-2, 2001.

KAUFMAN, R. M., TAYLOR, R. K. The toxin co-regulated pilus: biogenesis and function. In: ***Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives** Wachsmuth, I.K., Blake, P. A., Olsvik, Ø. (eds).Washington, D.C, American Society for Microbiology, 1994, p. 187-202.

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

KERAMAT, F.; HASHEM, S. H.; MAMANI, M.; RANJBA, M.; ERFANI, H. Survey of antibiogram tests in cholera patients in the 2005 epidemic in Hamadan, Islamic Republic of Iran. **La Revue de Santé de la Méditerranée Orientale,** v. 14, p. 768-775, 2008.

KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1473, p. 108-122, 1999.

KIRCHMAN, D. L. Introduction and overview. In: KIRCHMAN, D.L. (Ed.). **Microbial Ecology of the Oceans**. 2nd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, p. 1-26, 2008.

KIRN, T. J., LAFFERTY, M. J., SANDOE, C. M. P., TAYLOR, R. K. Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology,** v. 35, p. 896-910, 2000.

KOBAYASHI, T.; ENOMOTO, S.; SAKAZAKI, R.; KUWAHARA, S. A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi´s medium (TCBS agar medium). **Nippon Saikingaku Zasshi,** v. 18, p.387-392, 1963.

KUSHMARO, A.; LOYA,Y.; FINE, M.; ROSENBERG, E. Bacterial infection and coral bleaching. **Nature**, v. 380, p. 396, 1996.

KWOK, A.Y.; WILSON, J. T.; COULTHART, M.; NG, L. K.; MUTHARIA, L.; CHOW, A.W. Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp*60 gene sequences. **Canadian Journal of Microbiology,** v. 48, p. 903-910, 2002.

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

LANDAIS, S.; GOUNON, P.; LAURENT-WINTER, C.; MAZIÉ, J. C.; DANCHIN, A.; BÂRZU, O.; SAKAMOTO, H. Immunochemical analysis of UMP kinase from *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 833-40, 1999.

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

LEE, Y. L.; HUNG, P. P.; TSAI, C. A.; LIN, Y. H.; LIU, C. E. Clinical characteristics of nonO1/nonO139 *Vibrio cholerae* isolates and polymerase chain reaction analysis of their virulence factors. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, p. 474-480, 2007.

LEE, J. Y.; PARK, J. S.; OH, S. H.; KIM, H. R.; LEE, J. N.; SHIN, J. H. Acute infectious peritonitis caused by *Vibrio fluvialis.* **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 216-218, 2008.

LEVY, S. B. Antibiotic resistance: consequences of inaction. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 124-129, 2001.

LI, M. Comparative genomic analysis of the *Vibrio* pathogenicity island and cholera toxin prophage regions in nonepidemic serogroup strains of *Vibrio cholerae.* **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 69, p.1728-1738, 2003.

LIPP, E. K.; RIVERA, I. N. G.; GIL, A. I.; ESPELAND, E. M.; CHOOPUN, N.; LOUIS, V. R.; RUSSEK-COHEN, E.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Direct detection of *Vibrio cholerae* and *ctx*A in Peruvian Coastal water and plankton by PCR. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 69, p. 3676-3680, 2003.

LIU, P.C., LEE, K.K., CHEN, S.N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 413–416, 1996.

LOREAU, M.; NAEEM, S.; INCHAUSTI, P. (2002) Biodiversity and ecosystem functioning: synthesis and perspectives. New York: Oxford University Press, 308 p.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L.W.; de BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 81–125, 1999.

LOZANO-LEÓN, A.; TORRES, J.; OSORIO, C. R.; MARTÍNEZ-URTAZA, J. Identication of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain**.** **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, p. 281-284, 2003.

MAGALHÃES, V.; LIMA, R. A.; TATENO, S.; MAGALHÃES, M. Human gastroenteritis associated with *Vibrio parahaemolyticus* in Recife, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p. 64-68, 1991.

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.

MAIDEN, M. C., BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 95, p. 3140-3145, 1998.

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

MANDAL, M.; PREETHI, V.; VASANTHRAJA, R.; SRINIVASAN, S.; SUBSHASH, C. P. Resistance to ceftriaxone in *Vibrio cholerae.* **Indian Journal of Medical Research**, v. 136, p. 674-675, 2012.

MANDOMANDO, I.; ESPASA, V. X.; SACARLAL, J.; SIGAU, B.; RUIZ, J.; ALONSO, P. Antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa isolated in Manchaca District Hospital, southern Mozambique. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 60, p. 662-664, 2007.

MANJUSHA, S.; SARITA, G. B.; ELYAS, K. K.; CHANDRASEKARAN, M. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 201-206, 2005.

MARKMAN, C. V. **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**. 2008. 192f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; DEVOS, P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 57, p. 489-503, 2007.

MARTÍNEZ, J. L. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. **Science**, v. 321, p. 365-367, 2008.

MARTINEZ-MURCIA, A. J., MONERA, A., SAAVEDRA, M. J., ONCINA, R., LOPEZ-ALVAREZ, M., LARA, E., FIGUERAS, M. J. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 189-199, 2011.

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. 2005. 215 f. Tese (Doutorado em Oceanografia) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MAYER, C. **Detecção molecular e resistência a antimicrobianos no grupo *V.fluvialis* – *V.furnissii*.** 2010. 98p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública, USP, São Paulo.

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

MEIBOM, K. L.; LI, X. B.; NIELSEN, A. T.; WU, C. Y.; ROSEMAN, S.; SCHOOLNIK, G. K. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 2524-2529, 2004.

MEKALANOS, J. J. Cholera toxin: genetic analysis, regulation, and role in pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 118, p. 97-118, 1985.

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

MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of 16S rRNA, ITS, *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2934-2950, 2009.

MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P. A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1432-1441, 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Macrodiagnóstico da Zona Costeira e Marinha do Brasil. Brasília: MMA, 2008. 242 p.

MILLER, R. V.; GAMMOM, K.; DAY, M. J. Antibiotic resistance among bacteria isolated from seawater and penguin fecal samples collected near Palmer Station, Antarctica. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 37-45, 2009.

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

NAKANISHI, Y. An isolation agar medium for cholerae and entropathogenic halophilic vibrios. **Modern Media**, v. 9, p. 246, 1963.

NASER, S.; THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; THOMPSON, C. C.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Phylogeny and identification of enterococci by *atpA* gene sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2224–2230, 2005.

NEDASHKOVSKAYA, O. I.; STENKOVA, A. M.; ZHUKOVA, N. V.; TRAPPEN, S. V.; LEE, J. S.; KIM, S. B. *Echinimonas agarilytica* gen. nov., sp. nov., a new gammaproteobacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius.* **Antonie van Leeuwenhoek,** v. 103, p. 69-77, 2013.

NHUNG, P. H.; SHAH, M. M.; OHKUSU, K.; NODA, M.; HATA, H.; SUN, X. S.; IIHARA, H.; GOTO, K.; MASAKI, T.; MIYASAKA, J.; EZAKI, T. The *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 309-315, 2007.

NGUYEN, D. T.; NGO, T. C.; TRAN, H. H.; NGUYEN, T. P.; NGUYEN, B. M.; MORITA, K.; EHARA, M. Two different mechanisms of ampicillin resistance operating in strains of *Vibrio cholerae* O1 independent of resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 298, n. 1, p. 37-43, 2009.

NISHIBUCHI, M.; KAPER, J. B. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 87-99, 1990.

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence Heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

OCTAVIA, S.; SALIM, A.; KURNIAWAN, J.; LAM, C.; LEUNG, Q. Population Structure and Evolution of Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* by Multilocus Sequence Typing. **Plos One**, doi:10.1371/journal.pone.0065342, v.8, 2013.

OGAWA, A.; KATO, J. J.; WATANABE, H.; NAIR, B. G.; TAKEDA, T. Clonning and nucleotide sequence of a heat-stable enterotoxin gene from *Vibrio cholerae* Non-O1 isolated from a patient with traveler's with diarrhea. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 3325-3329, 1990.

OKEKE, I. N.; ABODERIN, O. A.; BYARUGABA, D. K.; OJO, K. K.; OPITAN, J. A. Growing Problem of Multidrug- Resistant Enteric Pathogens in Africa. **Emerging Infectious Disease**, v. 13, p. 1640- 1646, 2007.

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

OLIVEIRA, K. Z. **Construção de árvores filogenéticas baseadas em genomas completos.** 2010. 87p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Computação, UNICAMP, Campinas, 2010.

OLIVER, J. D.; WARNER, R. A.; CLELAND, D. R. Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 985-998, 1983.

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

OTTAVIANI, D.; BACCHIOCCHI, I.; MASINI, L.; LEONI, F.; CARRATURO, A.; GIAMMARIOLI, M.; SBARAGLIA, G. Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. **International Journal of Antimicrobiology Agents**, v. 18, p. 135-140, 2001.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **The FASEB Journal**, v. 7, p. 113-123, 1993.

PAGES J. M. Bacterial porin and antibiotic susceptibility. **Médecine Sciences**, v. 20, p. 346-351, 2004.

PAILLARD, C.; LE ROUX, F.; BORREG, J. J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. **Aquatic Living Resources,** v. 17, p. 477–498, 2004.

PAL, A.; RAMAMURTHY T.; BHADRA, R. K.; TAKEDA, T.; SHIMADA, T.; TAKEDA, Y.; NAIR, G. B.; PAL, S. C.; CHAKRABARTI, S. Reassessment of the prevalence of heat-stable enterotoxin (NAG-ST) among environmental *Vibrio cholerae* Non-O1 strains isolated from Calcutta, India by using a NAG-ST DNA probe. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2485-2489, 1992.

PASCUAL, J.; MACIÁN, C. M.; ARAHAL, D. R.; GARAY, E.; PUJALTE, J. Multilocus Sequence Analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB*, and *toxR* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 154-165, 2010.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, 2007.

POLLITZER, R. Cholera, Geneva. World Health Organization (Monograph Series n. 43), 1959.

PRUZZO, C., VEZZULLI, L., COLWELL, R. R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. **Environmental Microbiology,** v. 10, p. 1400-1410, 2008.

RAMESHKUMAR, N.; FUKUI, Y.; SAWABE, T.; NAIR, S. *Vibrio porteresiae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a mangrove-associated wild rice (*Portesia coarctata* Tateoka). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1608-1615, 2008.

REGUERA, G., KOLTER, R. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 3551-3555, 2005.

RICHTER, D.; POSTIC, D.; SERTOUR, N.; LIVEY, I.; MATUSCHKA, F.R.; BARANTON, G. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and

confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 56, p. 1043-1047, 2006.

RISTORI, C. A., IARIA, S. T., GELLI, D., RIVERA, I. N. G. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliana*) and estuarine water along the South Coast of Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 17, p. 59-269, 2007.

RIVERA, I. N. G., PAULA, C. R., SOUZA, C. P. Microbiologia Aquatica Marinha. IN: Mello, I.S. & Azevedo, JL. Microbiologia ambiental. 2 ed. Jaguariuna: EMBRAPA, 2008, p. 619-627.

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

RIVERA, I. N. G.; CHUN, J.; HUQ, A.; SACK, R. B.; COLWELL, R. R. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae.* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2421-2429, 2001.

RODRIGUES, D. P., HOFER, E. *Vibrios* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 17, p. 332-338, 1986.

RODRIGUES, L. A. P. Avaliação do risco microbiológico por *Vibrio parahaemolyticus* em ostras nativas (*Crassostrea rhizophorae)*cultivadas na Baia de Todos os Santos. 2009. 174 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2009.

RODRIGUEZ, L. E. C.; MONROY, S. P.; MORIER, L.; ALVAREZ, M. M. R.; ABREU, A. F.; ESCARPULLI, G. C. Severe otitis due to *Vibrio fluvialis* in a patient with AIDS: first report in the world. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 57, n. 2, p. 154-155, 2005.

ROHWER, F.; SEGURITAN, V.; AZAM, F.; KNOWLTON, N. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine ecology progress series**, v. 243, p. 1-10, 2002.

RONG, X.; GUO, Y.; HUANG, Y. Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *solvifaciens*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 314-322, 2009.

ROQUE, A.; MOLINA-AJA, A.; BOLÁN-MEJÍA, C.; GOMEZ-GIL, B. In Vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 383-387, 2001.

ROSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryoutes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 36-67, 2001.

ROYCHOWDHURY, A.; PAN, A.; DUTTA, D.; MUKHOPADHYAY, A. K; RAMAMURTHY, T.; NANDY, R. K.,; BHATTACHARYA, S. K.; BAHATTACHARYA, M. K. Emergence of Tetracycline- Resistant *Vibrio cholerae* O1 Serotype Inaba, in Kolkata, India. **Japanese Journal of Infectious Disease,** v. 61, p. 128-129, 2008.

SAEED, M. O. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. **Aquaculture**, v. 136, p. 21-29, 1995.

SAHILAH, A. M.; LAILA, R. A. S.; SALLEHUDDIN, H. M.; OSMAN, H.; AMINAH, A.; AZUHAIRI, A. A. Antibiotic resistance and molecular typing among cockle (*Anadara granosa*) strains of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction (PCR)-based analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 649-659, 2014.

SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; KATO, T.; OBARA, Y.; YAMAI, S. Studies on the enterophatogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticu*s. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, v. 21, p. 325-331, 1968.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. (1989) **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 545p.

SANTOS, Y.; ROMALDE, J. L.; BANDIN, I.; MAGARINOS, B.; NUNEZ, S.; BARJA, J. L.; TORANZO, A. E. Usefulness of the API 20E system for the identification of bacterial fish pathogens. **Aquaculture,** v. 116, p. 111–120, 1993.

SAWABE, T.; KITA-TSUKAMOTO, K.; THOMPSON, F.L. Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 7932–7936, 2007.

SAWABE, T.; OGURA, Y.; MATSUMURA, Y.; FENG, G.; AMIN, A.R.; MINO, S.; NAKAGAWA, S.; SAWABE, T.; KUMAR, R.; FUKUI, Y.; SATOMI, M.; MATSUSHIMA, R.; THOMPSON, F. L.; GOMEZ-GIL, B.; CHRISTEN, R.; MARUYAMA, F.; KUROKAWA, K.; HAYASHI, T. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-14, 2013.

SCHULZE, E.D.; MOONEY, H.A. **Biodiversity and ecosystem function**. Berlin, Springer-Verlag, p. 93-112, 1994.

SHEU, S.; JIANG, S.; CHEN, C. A; WANG, J., CHEN, W. *Vibrio stylophorae* sp. nov., isolated from the reef-building coral *Stylophora pistillata* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61 p. 2180-2185, 2011.

SHI, L., MIYOSHI, S., HIURA, M., TOMOCHIKA, K., SHIMADA, T., SHINODA, S. Detection of genes encoding cholera toxin (CT), zonula occludens toxin (ZOT), accessory cholera enterotoxin (ACE) and heat-stable enterotoxin (ST) in *Vibrio mimicus* clinical strains. **Microbiology and Immunology,** v. 42, p. 823-828, 1998.

SHIVU, M. M.; RAJEEVA, B. C. Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 322-331, 2007.

SILVA, L. S.; MIRANDA, L. B.; CASTRO, B. M. Relatório do projeto "Oceanografia da Plataforma Interna de São Sebastião" (OPISS) Subprograma Oceanografia Física. **Relatórios Técnicos do Instituto Oceanográfico**, v. 47, p. 1-31, 2001.

SIMPSON, L. M.; WHITE, V. K.; ZANE, S. F.; OLIVER, J. D. Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. **Infection and Immunity**, v. 55, p. 269-272, 1987.

SOLER, L.; YANEZ, M. A.; CHACON, M. G.; AGUILERA-ARREOLA, M. G.; CATALAN, V.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1511-1519, 2004.

SOUZA, K. M. C. **Qualidade Microbiológica de Água de Lastro de Navios, Água e Bivalves da Região Portuária Brasileira, com ênfase na Detecção de *Vibrio cholerae* O1.** 2007. 198f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SOUZA-SALES, C. P. **Diversidade de bactérias quitinolíticas isoladas em amostras de água do mar e plâncton coletadas na região costeira do Estado de São Paulo**. 2009. 205 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOUZA, T. A.; CUNHA, C. M. L. O litoral sul do Estado de São Paulo: uma proposta de compartimentação geomorfológica. **Caminhos de Geografia**, v. 12, n. 37, p. 107-123, 2011.

STALEY, J. 1998. Microbial Diversity and the Biosphere. Disponível em: <www.bdt.org.br/oea/sib/staley>. Acesso em: 10 out 2010.

STROM, M. S.; PARANJPYE, R. N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 177-188, 2000.

SUGINTA, W. Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 212-220, 2007.

SUTHIENKUL, O.; ISHIBASHI, M.; IIDA, T.; NETTIP, N.; SUPAVEJ, S.; EAMPOKALAP, B.; MAKINO, M.; HONDA, T. Urease production correlates with possession of the trh gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. **Journal of Infectious Disease**, v. 172, n. 5, p. 1405-1408, 1995.

SVITIL, A. L.; NÍ CHADHAIN, S. M.; MOORE, J. A.; KIRCHMAN, D. L. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* on different forms of chitin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 408-413, 1997.

TACKET, C. O.; HICKMAN, F.; PIERCE, G. V.; MENDOZA, L. F. Diarrhea associated with *Vibrio fluvialis* in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 991-992, 1982.

TAGOMORI, K.; IIDA, T.; HONDA, T. Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 16, p. 4351-4358, 2002.

TAKEDA, T.; PEINA, Y.; OGAWA, A.; DCHI, S.; ABE, H.; NAIR, G. B.; PAL, S. C. Detection of heat-stable enterotoxin in a cholera toxin gene-positive strain of *Vibrio cholera* O1. **FEMS Microbiology Letters,** v. 80, p. 23-8, 1991.

TALL, A.; HERVIO-HEATH, D.; TEILLON, A.; BOISSET-HELBERT, C.; DELESMONT, R.; BODILIS, J.; TOURON-BODILIS, A. Diversity of Vibrio spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by pyr*H* sequencing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1713-1724, 2013.

TARAZONA, E.; PEREZ-CATALUNA, A.; LUCENA, T.; ARAHAL, D. R.; MACIAN, M. C.; PUJALTE, M. J. Multilocus Sequence Analysis of the redefined clade *Scophthalmi* in the genus-*Vibrio*. **Systematic and Applied Microbiology**, 2015.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos** 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. 792p.

TAYLOR, R. K.; MILLER V. L.; FURLONG, J. J.; MEKALANOS, J. B. The use of *pho*A gene fusion to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84 p. 2833-2837, 1987.

THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; VICENTE, A. C. P. Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 617-621, 2008.

THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; VICENTE, A. C. P.; SWINGS, J. Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of *atpA* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2480–2484, 2007.

THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Taxonomy of Vibrios. In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The Biology of Vibrios**. Washington D. C.: ASM Press, 2006. p. 29-43.

THOMPSON, F. L.; OLIVEIRA, V. M. Taxonomia de Procariotos. **Divisão de Recursos Microbianos & Coleção Brasileira de Micro-organismos do Ambiente e Indústria (CBMAI),** UNICAMP, 2006. Disponível em: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ghjxo3ihnu8J:www.cria.org.br/cgee/junho/docs/Taxonomiaemprocariotos_revisedfabianovaleriav5.doc+TAXONOMIA+DE+PROCARIOTOS&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>. Acesso em: 5 de out de 2010.

THOMPSON, F. L., GEVERS, D., THOMPSON, C. C., DAWYNDT, P., NASER, S.,HOSTE, B., MUNN, C. B.; SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5107–5115, 2005.

THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; VANDEMEULEBROECKE, K.; HOSTE, B.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 919-924, 2004a.

THOMPSON, F. L., IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 68, p. 403–431, 2004b.

THOMPSON, F. L.; LI, Y.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, C. C.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; RUPP, G. S.; A.; PEREIRA, A.; DEBEM, M. M.;

SORGELOOSAND, P.; SWINGS, J. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 245-252, 2003.

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: ASM Press, D. C. 2006. p. 190-203.

URAKAWA, H.; RIVERA, I. N. G. Aquatic environment. IN: Thompson, F.L., Austin, B.,Swings, J. (Eds).**The Biology of Vibrios**. Washington D. C.: ASM Press, 2006. p. 175-189.

URBANCZYK, H.; AST, J. C.; HIGGINS, M. J.; CARSON, J.; DUNLAP, P. V. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb., nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2823-2829, 2007.

VEZZULLI, L., GUZMÁN, C. A., COLWELL, R. R., PRUZZO, C. Dual role colonization factors connecting *Vibrio cholerae's* lifestyles in human and aquatic environments open new perspectives for combating infectious diseases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 254-259, 2008.

VICENTE, A. C. P.; COELHO, A. M.; SALLES, C. A. *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* heat-stable toxin gene sequence detection by PCR. **Journal of Medical Microrobiology,** v. 46, p. 1-5, 1997.

VIEIRA, R. H. S. F.; GESTEIRA, T. C. V.; MARQUES, L. C.; MARTINS, P. C. C.; MONTEIRO, C. M.; CARVALHO, R. L. *Vibrio* spp. e suas implicações sobre larviculturas de camarões marinhos. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 33, p. 107-112, 2000.

VOSSBRINCK, C. R.; BAKER, M. D.; DIDIER, E. S.; EBRUNNER-VOSSBRINCK, B. A.; SHADDUCK, J. A. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, p. 354-362, 1993.

URAKAWA, H.; KITA-TSUKAMOTO, K.; OHWADA, K. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family *Vibrionaceae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, p. 125-132, 1997.

WANG, L.; CHEN, Y.; HUANG, H.; HUANG, Z.; CHEN, H.; SHAO, Z. Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 395-404, 2015.

WANG, Y.; LEUNG, P. C.; PEI-YUAN, Q.; JI-DONG, G. U. Antibiotic resistance and plasmid profile of environmental isolates of *Vibrio* species from Mai Po Nature Reserve, Hong Kong. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 371–378, 2006.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

YAMAMOTO, S., KASAI, H., ARNOLD, D. L., JACKSON, R. W., VIVIAN, A., HARAYAMA, S. Phylogeny of the genus Pseudomonas: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. **Microbiology**, v. 146, p. 2385-2394, 2000.

YUAN, P.; OGAWA, A.; RAMAMURHTY, T. *Vibrio mimicus* are the reservoirs of the heat-stable enterotoxin gene (*nag-st*) among the species of the genus *Vibrio*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 59-63, 1994.

YOSHIDA, S.; OGAWA, M.; MIZUGUCHI, Y. Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. **Infection and Immunity**, v. 47, n. 2, p. 446-451, 1985.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C. Probable synonymy of the nitrogen-fixing genus *Azotobacter* and the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2894-2901, 2007.

ZAMPINI, M., PRUZZO, C., BONDRE, V. P., TARSI, R., COSMO, M., BACCIAGLIA, A., CHHABRA, A., SRIVASTAVA, R., SRIVASTAVA, B .S. *Vibrio cholerae* persistence in aquatic environments and colonization of intestinal cells: involvement of a common adhesion mechanism. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 267-273, 2005.

ZEIGLER, D. R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1893–1900, 2003.

ZO, G.; RIVERA, I. N. G.; RUSSEK-COHEN, E; ISLAM, M. S.; SIDDIQUE, A. K.; YUNUS, M.; SACK, R. B; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Genomic profiles of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* O1 in cholera endemic areas of Bangladesh. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 19, p. 12409–12414, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE 1A- Local, data e ponto da coleta, tipo de amostra e da coloração da colônia no meio seletivo TCBS e no CHROMagar dos isolados de vibrios de Ubatuba

ISOLADOS	LOCALIZAÇÃO	DATA DA COLETA	PONTOS	TIPOS	COR DA COLONIA NO TCBS	CROMOGENICO
PF 51	23º30'41''S, 45º06'04''W	13/02/2006	P2	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PF 53	23º30'41''S, 45º06'04''W	13/02/2006	P2	AGUA	VERDE	BRANCA
PF 61	23º30'41''S, 45º06'04''W	13/02/2006	P2	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 62	23º30'41''S, 45º06'04''W	13/02/2006	P2	PLANCTON	AMARELA	MALVA
PF 66	23º30'41''S, 45º06'04''W	13/02/2006	P2	PLANCTON	AMARELA	NÃO CRESCEU
PF 68	23º30'41''S, 45º06'04''W	13/02/2006	P2	PLANCTON	AMARELA	MALVA
PF 263	23º30'02''S, 45º07'07''W	21/03/2006	P1	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 267	23º30'02''S, 45º07'07''W	21/03/2006	P1	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 294	23º30'02''S, 45º07'07''W	21/03/2006	P1	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 297	23º30'02''S, 45º07'07''W	21/03/2006	P1	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 597	23º30'41''S, 45º06'04''W	30/05/2006	P2	AGUA	VERDE	MALVA
PF 599	23º30'41''S, 45º06'04''W	30/05/2006	P2	AGUA	AMARELA	AZUL
PF 601	23º30'41''S, 45º06'04''W	30/05/2006	P2	AGUA	AMARELA	AZUL
PF 604	23º30'41''S, 45º06'04''W	30/05/2006	P2	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 611	23º30'41''S, 45º06'04''W	30/05/2006	P2	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	NÃO CRESCEU
PF 614	23º30'41''S, 45º06'04''W	30/05/2006	P2	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 617	23º30'41''S, 45º06'04''W	30/05/2006	P2	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA

APÊNDICE 1B- Identificação bioquímica realizada através do API 20E dos isolados de vibrios de Ubatuba

API 20 E	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	SOMA	PERFIL	IDENTIFICAÇÃO
PF51	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	P	1-0-6-0-1-2-4	INACEITAVEL	Taxon significativo *V.fluvialis*
PF53	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	4-0-0-2-0-0-4	FRACA DISCRIMINAÇÃO	60,8% *Burkholderia cepacia*
PF61	P	P	N	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	3-0-6-6-1-2-6	DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis 71,7%*
PF62	P	P	N	N	P	N	N	P	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	3-2-6-2-1-2-6	INACEITAVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF66	P	P	N	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	3-0-6-6-1-2-6	DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis 71,7%*
PF68	P	P	N	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	3-0-6-6-1-2-6	DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis 71,7%*
PF263	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	4-1-6-4-1-2-4	DUVIDOSO	98,5% *V.alginolyticus*
PF267	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	P	P	4-0-4-0-0-2-5	INACEITAVEL	99,7% *V.alginolyticus*
PF294	N	P	P	N	P	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	6-2-6-6-1-2-4	INACEITAVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF297	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-6-1-2-4	DUVIDOSO	Taxon significativo *V.alginolyticus*
PF597	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N	P	P	P	4-0-6-4-1-0-5	INACEITAVEL	*V. parahaemolyticus*
PF599	P	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	N	5-0-6-6-1-2-5	DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF601	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	N	5-0-0-6-1-2-5	BOA IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF604	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-6-1-2-4	DUVIDOSO	99,7% *V.alginolyticus*
PF611	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N	P	P	P	4-0-6-4-1-0-5	INACEITAVEL	*V. parahaemolyticus*
PF614	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-1-6-6-1-2-4	DUVIDOSO	97,7% *V.alginolyticus*
PF617	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	P	4-1-6-6-1-2-4	DUVIDOSO	97,7% *V.alginolyticus*

Legenda: N – negativo; P – positivo

APÊNDICE 2A- Local, data e ponto da coleta, tipo de amostra e coloração da colônia no meio seletivo TCBS e no CHROMagar dos isolados de vibrios da Baixada Santista

ISOLADOS	LOCALIZAÇÃO	DATA DA COLETA	PONTOS	TIPOS	COR DA COLONIA NO TCBS	CROMOGENICO
PF 167	23º98'56''S, 46º37'10''W	17/02/2006	P1	ÁGUA	AMARELA	BRANCA
PF 354	23º98'56''S, 46º37'10''W	28/03/2006	P1	ÁGUA	VERDE	MALVA
PF 356 (1)	23º98'56''S, 46º37'10''W	28/03/2006	P1	ÁGUA	VERDE ESCURA PEQUENA	MALVA
PF 356 (2)	23º98'56''S, 46º37'10''W	28/03/2006	P1	ÁGUA	VERDE AMARELADA GRANDE	MALVA
PF 383	23º98'62''S, 46º31'33''W	28/03/2006	P3	ÁGUA	VERDE	BRANCA
PF 397	24º02'25''S, 46º32'83''W	28/03/2006	P2	PLANCTON	VERDE	BRANCA
PF 462	23º98'56''S, 46º37'10''W	27/04/2006	P1	ÁGUA	VERDE	NÃO CRESCEU
PF 469	23º98'56''S, 46º37'10''W	27/04/2006	P1	ÁGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 472	23º98'56''S, 46º37'10''W	27/04/2006	P1	ÁGUA	VERDE	AZUL
PF 482	24º02'25''S, 46º32'83''W	27/04/2006	P2	ÁGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 483	24º02'25''S, 46º32'83''W	27/04/2006	P2	ÁGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 484	24º02'25''S, 46º32'83''W	27/04/2006	P2	ÁGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 486	24º02'25''S, 46º32'83''W	27/04/2006	P2	ÁGUA	AMARELA	BRANCA
PF 488	24º02'25''S, 46º32'83''W	27/04/2006	P2	ÁGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 495	24º02'25''S, 46º32'83''W	27/04/2006	P2	PLANCTON	VERDE	MALVA
PF 534 (1)	24º02'25''S, 46º32'83''W	27/04/2006	P2	BIVALVE	AMARELA	BRANCA
PF 534 (2)	24º02'25''S, 46º32'83''W	27/04/2006	P2	BIVALVE	VERDE AMARELADA	BRANCA
PF 534 (3)	24º02'25''S, 46º32'83''W	27/04/2006	P2	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 620	23º98'56''S, 46º37'10''W	01/06/2006	P1	ÁGUA	VERDE	MALVA
PF 623 (1)	23º98'56''S, 46º37'10''W	01/06/2006	P1	ÁGUA	VERDE ESCURA PEQUENA	MALVA
PF 623 (2)	23º98'56''S, 46º37'10''W	01/06/2006	P1	ÁGUA	VERDE GRANDE	MALVA
PF 635	23º98'56''S, 46º37'10''W	01/06/2006	P1	ÁGUA	AMARELA GRANDE	BRANCA
PF 639	23º98'56''S, 46º37'10''W	01/06/2006	P1	ÁGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 643	23º98'56''S, 46º37'10''W	01/06/2006	P1	PLANCTON	VERDE	BRANCA
PF 657	24º02'25''S, 46º32'83''W	01/06/2006	P2	ÁGUA	VERDE	BRANCA
PF 662	24º02'25''S, 46º32'83''W	01/06/2006	P2	ÁGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 663	24º02'25''S, 46º32'83''W	01/06/2006	P2	ÁGUA	VERDE	AZUL
PF 664 (1)	24º02'25''S, 46º32'83''W	01/06/2006	P2	ÁGUA	AMARELADA GRANDE	BRANCA
PF 664 (2)	24º02'25''S, 46º32'83''W	01/06/2006	P2	ÁGUA	VERDE ESCURA PEQUENA	BRANCA
PF 669	24º02'25''S, 46º32'83''W	01/06/2006	P2	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 687	23º98'62''S, 46º31'33''W	01/06/2006	P3	ÁGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 688	23º98'62''S, 46º31'33''W	01/06/2006	P3	ÁGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 689 (1)	23º98'62''S, 46º31'33''W	01/06/2006	P3	ÁGUA	VERDE ESCURA GRANDE	NÃO CRESCEU
PF 689 (2)	23º98'62''S, 46º31'33''W	01/06/2006	P3	ÁGUA	VERDE PEQUENA	NÃO CRESCEU
PF 689 (3)	23º98'62''S, 46º31'33''W	01/06/2006	P3	ÁGUA	AMARELA	NÃO CRESCEU
PF 697	23º98'62''S, 46º31'33''W	01/06/2006	P3	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PF 699	23º98'62''S, 46º31'33''W	01/06/2006	P3	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA

APÊNDICE 2B- Identificação bioquímica realizada através do API 20E dos isolados de vibrios da Baixada Santista

API 20 E	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	SOMA	PERFIL	IDENTIFICAÇÃO
PF 167	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	N	P	1-0-6-6-1-2-5-2	Duvidoso	Possibilidade de *Vibrio fluvialis*
PF 354	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	4-0-6-6-1-0-7-3	Inaceitável	*Vibrio parahaemolyticus*
PF 356 (1)	P	P	P	N	P	N	N	P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	P	P	7-2-6-7-1-2-6-3	Duvidoso	Possibilidade de Vibrio fluvialis
PF 356 (2)	P	N	P	P	N	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	5-1-6-4-1-0-4-1	Duvidoso	85,5% *Vibrio mimicus*
PF 383	P	N	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	1-2-0-3-0-0-0-3	Duvidoso	Taxon significativo 48,5% *Pseudomonas luteola*
PF 397	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	0-0-4-2-1-0-4-2	Identificação Incorreta	78,4% *Aeromonas salmonicida*
PF 462	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	0-0-0-0-0-0-4-1	Fraca Discriminação	Possibilidade de *Brucella* spp
PF 469	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	N	P	4-0-0-4-1-6-5-2	Inaceitável	Possibilidade de *Vibrio fluvialis*
PF 472	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	4-0-6-2-0-0-5-1	Inaceitável	*Vibrio vulnificus*
PF 482	N	N	P	N	N	N	N	P	P	P	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	4-0-6-5-1-2-4-1	Duvidoso	99,3% *Vibrio alginolyticus*
PF 483	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	4-0-6-2-1-2-4-1	Duvidoso	99,6% *Vibrio alginolyticus*
PF 484	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	P	4-0-6-6-1-2-4-2	Duvidoso	99,7% *Vibrio alginolyticus*
PF 486	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	4-0-6-6-1-2-4-1	Duvidoso	99,7% *Vibrio alginolyticus*
PF 488	N	N	P	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	N	4-0-6-7-1-2-5-1	Inaceitável	*Vibrio alginolyticus*
PF 495	N	N	P	P	N	N	N	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	4-1-6-7-1-0-7-1	Inaceitável	*Vibrio alginolyticus*
PF 534 (1)	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-6-1-2-4-3	Duvidoso	99,7% *Vibrio alginolyticus*
PF 534 (2)	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	4-1-6-4-1-2-4-1	Duvidoso	98,5% *Vibrio alginolyticus*
PF 534 (3)	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	4-0-6-4-1-2-4-1	Duvidoso	99,8% *Vibrio alginolyticus*
PF 620	N	N	P	P	P	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	P	P	P	N	4-3-6-6-1-2-7-1	Inaceitável	*Vibrio alginolyticus*
PF 623 (1)	N	N	P	P	P	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	4-3-6-4-1-0-4-3	Duvidoso	97,9% *Vibrio parahaemolyticus*
PF 623 (2)	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	4-0-6-6-1-0-4-2	Duvidoso	77,5% *Vibrio parahaemolyticus*
PF 635	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	0-0-2-7-0-0-0-2	Inaceitável	Possibilidade de *Acinetobacter baumannii*
PF 639	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	4-0-6-2-0-0-4-2	Inaceitável	*Chryseobacterium meningosepticum*
PF 643	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	P	4-0-6-0-0-0-1-3	Inaceitável	*Providencia alcalifaciens*
PF 657	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	4-0-2-0-0-0-4-1	Duvidoso	Possibilidade de *Brucella* spp
PF 662	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	P	N	4-0-6-0-0-2-5-1	Inaceitável	*Vibrio alginolyticus*
PF 663	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	5-0-0-2-0-0-4-1	Fraca Discriminação	62,9% *Burkholderia cepacia*
PF 664 (1)	P	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	5-0-6-0-0-0-5-1	Inaceitável	*Vibrio vulnificus*
PF 664 (2)	P	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	5-0-6-2-1-0-4-0	Duvidoso	61% *Vibrio mimicus*
PF 669	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	P	4-0-6-4-1-2-5-3	Duvidoso	99,5% *Vibrio alginolyticus*
PF 687	P	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	P	N	P	N	P	5-0-6-0-1-2-5-2	Inaceitável	Possibilidade de *Vibrio fluvialis*
PF 688	P	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	P	P	5-0-6-2-0-2-5-3	Inaceitável	Possibilidade de *Vibrio fluvialis*
PF 689 (1)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	0-0-0-0-0-0-4-1	Fraca Discriminação	Possibilidade de *Brucella* spp
PF 689 (2)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	0-0-0-0-0-0-4-1	Fraca Discriminação	Possibilidade de *Brucella* spp
PF 689 (3)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	0-0-0-0-0-0-4-1	Fraca Discriminação	Possibilidade de *Brucella* spp
PF 697	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	P	P	P	P	N	1-0-2-4-1-2-7-1	Inaceitável	Possibilidade de *Vibrio fluvialis*
PF 699	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-6-1-2-4-3	Duvidoso	99,7% *Vibrio alginolyticus*

Legenda: N – negativo; P – positivo

APÊNDICE 3A- Local, data e ponto da coleta, tipo de amostra e coloração da colônia no meio seletivo TCBS e no CHROMagar dos isolados de vibrios do Canal de São Sebastião

ISOLADOS	LOCALIZAÇÃO	DATA DA COLETA	PONTOS	TIPOS	COR DA COLONIA NO TCBS	CROMOGENICO
PF 79	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	AGUA	AMARELA	BRANCA
PF 84	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 100 (1)	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	AZUL
PF 100 (2)	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 101	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	AZUL
PF 104	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 107	23°49'56" S, 45°25'51" W	13/02/2006	P2	AGUA	AMARELA	NÃO CRESCEU
PF 111 (1)	23°49'56" S, 45°25'51" W	13/02/2006	P2	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 111 (2)	23°49'56" S, 45°25'51" W	14/02/2006	P2	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PF 114	23°49'56" S, 45°25'51" W	13/02/2006	P2	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	AZUL
PF 127 (1)	23°49'56" S, 45°25'51" W	13/02/2006	P2	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	AZUL
PF 127 (2)	23°49'56" S, 45°25'51" W	13/02/2006	P2	PLANCTON	AMARELA	AZUL
PF 134	23°49'56" S, 45°25'51" W	13/02/2006	P2	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 138	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PF 140	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	BIVALVE	AMARELA	MALVA
PF 143 (1)	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PF 143 (2)	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	BIVALVE	VERDE	MALVA
PF 144	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 145	23°49'50" S, 45°25'20" W	13/02/2006	P1	BIVALVE	VERDE	MALVA
PF 146 (1)	23°49'56" S, 45°25'51" W	13/02/2006	P2	BIVALVE	AMARELA	BRANCA
PF 146 (2)	23°49'56" S, 45°25'51" W	13/02/2006	P2	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 147	23°49'56" S, 45°25'51" W	13/02/2006	P2	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 149	23°49'56" S, 45°25'51" W	13/02/2006	P2	BIVALVE	AMARELA	BRANCA
PF 154	23°49'50" S, 45°25'20" W	20/01/2006	P1	BIVALVE	AMARELA	BRANCA
PF 156	23°49'50" S, 45°25'20" W	20/01/2006	P1	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 159	23°49'50" S, 45°25'20" W	20/01/2006	P1	BIVALVE	AMARELA	BRANCA
PF 320	23°49'50" S, 45°25'20" W	21/03/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 322	23°49'50" S, 45°25'20" W	21/03/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 323	23°49'50" S, 45°25'20" W	21/03/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 324	23°49'50" S, 45°25'20" W	21/03/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 326 (1)	23°49'50" S, 45°25'20" W	21/03/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PF 326 (2)	23°49'50" S, 45°25'20" W	21/03/2006	P1	PLANCTON	VERDE	MALVA
PF 329	23°49'56" S, 45°25'51" W	21/03/2006	P2	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 335	23°49'56" S, 45°25'51" W	21/03/2006	P2	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 336	23°49'56" S, 45°25'51" W	21/03/2006	P2	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 412	23°49'50" S, 45°25'20" W	25/04/2006	P1	PLANCTON	VERDE	AZUL
PF 414	23°49'50" S, 45°25'20" W	25/04/2006	P1	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	NÃO CRESCEU
PF 445	23°49'56" S, 45°25'51" W	25/04/2006	P2	Plancton	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 448	23°49'56" S, 45°25'51" W	25/04/2006	P2	Plancton	AMARELA CENTRO LARANJA	NÃO CRESCEU
PF 449	23°49'50" S, 45°25'20" W	25/04/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 453	23°49'56" S, 45°25'51" W	25/04/2006	P2	PLANCTON	AMARELA	BRANCA
PF 544	23°49'50" S, 45°25'20" W	30/05/2006	P1	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PF 555	23°49'56" S, 45°25'51" W	30/05/2006	P2	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	NÃO CRESCEU
PF 576	23°49'56" S, 45°25'51" W	30/05/2006	P2	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 577	23°49'50" S, 45°25'20" W	30/05/2006	P1	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 578	23°49'50" S, 45°25'20" W	30/05/2006	P1	BIVALVE	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PF 582	23°49'50" S, 45°25'20" W	30/05/2006	P1	AGUA	AMARELA	BRANCA
PSS 16	23°49'50" S, 45°25'20" W	17/10/2005	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PSS 18	23°49'50" S, 45°25'20" W	17/10/2005	P1	PLANCTON	AMARELA	MALVA
PSS 118	23°49'56" S, 45°25'51" W	16/11/2005	P2	PLANCTON	VERDE	BRANCA
PSS 126	23°49'50" S, 45°25'20" W	06/12/2005	P1	AGUA	VERDE	BRANCA
PSS 134	23°49'50" S, 45°25'20" W	06/12/2005	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PSS 163	23°49'50" S, 45°25'20" W	24/01/2006	P1	AGUA	VERDE	MALVA
PSS 181	23°49'56" S, 45°25'51" W	24/01/2006	P2	AGUA	VERDE	BRANCA
PSS 183	23°49'56" S, 45°25'51" W	24/01/2006	P2	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PSS 186	23°49'56" S, 45°25'51" W	24/01/2006	P2	AGUA	AMARELA	BRANCA
PSS 250	23°49'56" S, 45°25'51" W	20/06/2006	P2	AGUA	AMARELA	BRANCA
PSS 297	23°49'56" S, 45°25'51" W	18/07/2006	P2	AGUA	VERDE	BRANCA
PSS 298	23°49'56" S, 45°25'51" W	18/07/2006	P2	AGUA	VERDE	BRANCA
PSS 299	23°49'56" S, 45°25'51" W	18/07/2006	P2	AGUA	VERDE	AZUL
PSS 319	23°49'50" S, 45°25'20" W	22/08/2006	P1	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PSS 339	23°49'56" S, 45°25'51" W	22/08/2006	P2	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PSS 372	23°49'56" S, 45°25'51" W	19/09/2006	P2	AGUA	AMARELA	BRANCA
PSS 374	23°49'56" S, 45°25'51" W	19/09/2006	P2	AGUA	VERDE	BRANCA
PSS 380	23°49'56" S, 45°25'51" W	19/09/2006	P2	AGUA	VERDE	MALVA
PSS 399	23°49'50" S, 45°25'20" W	24/10/2006	P1	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PSS 405	23°49'50" S, 45°25'20" W	24/10/2006	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PSS 419	23°49'56" S, 45°25'51" W	24/10/2006	P2	AGUA	AMARELA	BRANCA
PSS 422	23°49'56" S, 45°25'51" W	24/10/2006	P2	AGUA	AMARELA	NÃO CRESCEU
PSS 434	23°49'50" S, 45°25'20" W	21/11/2006	P1	AGUA	VERDE	AZUL
PSS 436	23°49'50" S, 45°25'20" W	21/11/2006	P1	AGUA	VERDE	BRANCA
PSS 445	23°49'50" S, 45°25'20" W	21/11/2006	P1	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PSS 484	23°49'50" S, 45°25'20" W	24/01/2007	P1	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PSS 485	23°49'50" S, 45°25'20" W	24/01/2007	P1	AGUA	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PSS 488	23°49'50" S, 45°25'20" W	24/01/2007	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA
PSS 492	23°49'50" S, 45°25'20" W	24/01/2007	P1	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PSS 505	23°49'56" S, 45°25'51" W	24/01/2007	P2	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	BRANCA
PSS 506	23°49'56" S, 45°25'51" W	24/01/2007	P2	PLANCTON	AMARELA CENTRO LARANJA	MALVA

APÊNDICE 3B- Identificação bioquímica realizada através do API 20E dos isolados de vibrios do Canal de São Sebastião

API 20 E	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	SOMA	PERFIL	IDENTIFICAÇÃO
PF 79	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	P	1-0-6-0-0-2-5	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF 84	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	N	P	4-0-6-6-1-2-5	PERFIL DUVIDOSO	98,6% *V.alginolyticus*
PF 100 (1)	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-6-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	99,7% *V.alginolyticus*
PF 100 (2)	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	0-0-2-2-0-0-4	IDENTIFICAÇÃO INCORRETA	Possibilidade de *Brucella* spp.
PF 101	P	P	P	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	7-0-6-7-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF 104	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	N	4-0-6-2-1-2-5	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PF 107	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	0-0-2-2-0-0-4	IDENTIFICAÇÃO INCORRETA	Possibilidade de *Brucella* spp.
PF 111 (1)	P	P	N	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	3-0-6-6-1-2-6	PERFIL DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF 111 (2)	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	0-0-6-2-0-0-4	PERFIL DUVIDOSO	*Chryseobacterium meningosepticum*
PF 114	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	P	1-0-6-6-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF 127 (1)	P	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	3-0-6-4-1-2-6	PERFIL DUVIDOSO	87,9% *V.fluvialis*
PF 127 (2)	P	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	P	3-0-2-0-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	98,9% *V.fluvialis*
PF 134	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-0-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PF 138	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	P	P	P	N	P	2-0-6-2-1-2-7	PERFIL DUVIDOSO	94,4% *V.fluvialis*
PF 140	P	P	N	N	N	N	N	P	N	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	3-0-2-6-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	76,8% *V.fluvialis*
PF 143 (1)	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	P	N	1-0-2-6-1-2-6	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF 143 (2)	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	4-0-4-0-0-0-4	PERFIL DUVIDOSO	*Grimontia hollisae*
PF 144	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	P	N	1-0-2-6-1-2-6	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF 145	P	P	N	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	P	3-0-6-6-5-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF 146 (1)	P	P	N	N	P	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	P	P	P	P	3-2-6-6-1-2-7	PERFIL DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF 146 (2)	P	P	N	P	P	N	N	P	P	P	N	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	N	3-3-6-5-5-7-7	PERFIL INACEITÁVEL	*Enterobacter cloacae*
PF 147	P	P	N	P	P	N	N	P	P	P	N	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	N	3-3-6-5-5-7-7	PERFIL INACEITÁVEL	*Enterobacter cloacae*
PF 149	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	N	4-0-6-6-1-2-5	PERFIL DUVIDOSO	98,6% *V.alginolyticus*
PF 154	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-0-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PF 156	P	P	N	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	3-3-6-7-7-7-7	PERFIL INACEITÁVEL	*Enterobacter cloacae*
PF 159	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-6-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	99,7% *V.alginolyticus*
PF 320	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-6-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	99,7% *V.alginolyticus*
PF 322	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	N	4-0-6-6-1-2-5	PERFIL DUVIDOSO	98,6% *V.alginolyticus*
PF 323	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	N	P	4-0-6-6-1-2-5	PERFIL DUVIDOSO	98,6% *V.alginolyticus*
PF 324	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-0-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PF 326 (1)	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-0-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PF 326 (2)	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-4-2-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	*V. parahaemolyticus*
PF 329	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	N	4-0-6-6-1-2-5	PERFIL DUVIDOSO	98,6% *V.alginolyticus*
PF 335	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	P	N	P	N	P	4-0-6-2-1-2-5	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PF 336	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	N	P	4-0-6-6-1-2-5	PERFIL DUVIDOSO	98,6% *V.alginolyticus*
PF 412	P	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	5-0-6-6-0-0-4	PERFIL DUVIDOSO	90,5% *V.vulnificus*
PF 414	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P	0-0-2-0-0-0-6	BOA IDENTIFICAÇÃO	95,9% *Ochrobactrum anthropi*
PF 445	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-1-6-6-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	97,7% *V.alginolyticus*
PF 448	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	4-0-2-4-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PF 449	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	P	4-0-6-2-1-2-5	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PF 453	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-0-6-6-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	99,7% *V.alginolyticus*
PF 544	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	P	N	P	N	P	4-0-6-2-1-2-5	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PF 555	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	P	2-0-2-0-0-6-7	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PF 576	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	4-1-6-6-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	97,7% *V.alginolyticus*
PF 577	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	P	N	P	N	P	P	P	4-0-6-4-1-2-5	PERFIL DUVIDOSO	99,6% *V.alginolyticus*
PF 578	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	4-0-6-0-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PF 582	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	4-0-6-0-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PSS 16	P	P	N	N	P	N	N	P	P	N	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	N	N	3-2-6-6-5-7-7	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 18	P	P	N	N	P	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	3-2-6-6-1-2-6	PERFIL DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 118	N	P	P	N	P	N	N	P	P	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	6-2-6-2-0-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 126	P	N	P	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	5-0-4-6-0-0-5	EXCELENTE IDENTIFICAÇÃO	99,9% *V.vulnificus*
PSS 134	P	P	P	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	N	7-3-6-7-5-7-7	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 163	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	4-0-4-6-0-0-4	IDENTIFICAÇÃO ACEITÁVEL DO GÊNERO	*V. parahaemolyticus*
PSS 181	P	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	P	P	P	N	P	5-0-6-6-1-2-7	PERFIL DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 183	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	2-0-4-0-1-2-6	MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO	99,6% *V.fluvialis*
PSS 186	P	P	N	N	N	N	N	P	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	P	3-0-6-2-1-2-4	PERFIL DUVIDOSO	97,4% *V.fluvialis*
PSS 250	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	1-0-2-2-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 297	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	1-0-2-2-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 298	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	4-0-4-0-0-0-4	IDENTIFICAÇÃO INCORRETA	75,4% *Grimontia hollisae*
PSS 299	P	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	5-0-4-4-0-0-5	BOA IDENTIFICAÇÃO	99,3% *V.vulnificus*
PSS 319	P	P	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	3-0-4-2-1-2-6	BOA IDENTIFICAÇÃO	97,7% *V.fluvialis*
PSS 339	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	P	P	6-0-4-0-0-2-5	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 372	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	0-0-2-0-0-0-4	FRACA DISCRIMINAÇÃO	Possibilidade de *Brucella* spp.
PSS 374	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	4-0-4-6-0-0-4	IDENTIFICAÇÃO ACEITÁVEL DO GÊNERO	*V. parahaemolyticus*
PSS 380	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	0-0-2-0-0-0-4	FRACA DISCRIMINAÇÃO	Possibilidade de *Brucella* spp.
PSS 399	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	P	4-0-6-4-0-2-5	PERFIL DUVIDOSO	95,6% *V.alginolyticus*
PSS 405	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	P	4-0-2-6-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	*V.alginolyticus*
PSS 419	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	0-0-4-0-0-0-4	FRACA DISCRIMINAÇÃO	Taxon significativo *Grimontia hollisae*
PSS 422	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	1-0-2-2-1-2-4	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 434	P	N	P	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	5-0-4-6-0-0-4	MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO	90,5% *V.vulnificus*
PSS 436	P	N	P	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	5-0-4-6-0-0-4	MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO	90,5% *V.vulnificus*
PSS 445	P	P	N	N	P	N	P	P	P	N	P	N	P	N	N	N	P	N	N	P	P	P	P	3-2-7-2-1-2-6	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 484	P	P	P	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	7-3-6-7-1-2-6	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 485	P	P	N	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	N	7-3-6-7-5-7-7	PERFIL INACEITÁVEL	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 488	P	P	N	N	P	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	3-2-6-6-1-2-6	PERFIL DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 492	P	P	N	N	P	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	P	P	3-2-6-4-1-2-6	PERFIL DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 505	P	P	P	N	P	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	N	P	7-2-6-6-1-2-6	PERFIL DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*
PSS 506	P	P	N	N	P	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	P	P	P	P	3-2-6-4-1-2-6	PERFIL DUVIDOSO	Possibilidade de *V.fluvialis*

Legenda: N – negativo; P – positivo