Diversidade e perfil plasmidial de bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo

ANDREA CABRAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública
Orientadora: Profa. Associada Maria Helena Matté

São Paulo

2005

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores. Ao usa-la, cite a fonte.

Assinatura:

Data: 10 de fevereiro de 2005

Semana que vem

Amanhã eu vou revelar
Depois eu penso em aprender
Daqui a uns dias eu vou dizer
O que me faz querer gritar

No mês que vem tudo vai melhorar
Só mais alguns anos e o mundo vai mudar
Ainda temos tempo até tudo explodir
Quem sabe quanto vai durar

A partir de amanhã eu vou discutir
Da próxima vez eu vou questionar
Na segunda eu começo a agir
Só mais duas horas pra eu decidir

Esse pode ser o último dia de nossas vidas
Última chance de fazer tudo ter valido a pena
Diga sempre tudo o que precisa dizer, arrisque mais pra não se arrepender

Nós não temos todo o tempo do mundo e esse mundo já faz muito tempo
O futuro é o presente, e o presente já passou

Não deixe nada pra depois, não deixe o tempo passar
Não deixe nada pra semana que vem, porque semana que vem pode nem chegar

Autor: Pitty

DEDICATÓRIA

"É preciso amar as pessoas
Como se não houvesse amanhã
Por que se você parar pra pensar
Na verdade não há"
Renato Russo

Ao meu pai, Luiz Cabral por todo o esforço, dedicação, apoio, amizade e pelo "investimento", fazendo com que eu chegasse até aqui.

À minha mãe, Áurea Abadia Cabral, pela atenção, pelas conversas nas horas difíceis e por todo apoio que tem dado, em todos os momentos da minha vida.

Obrigada meus pais, vocês são ótimos! Sem vocês, eu não estaria completando mais essa etapa da minha vida. Eu amo muito vocês!!

"(...) Bondoso e sem rancor, fiel e consciente
Humilde e sofredor, espera tão somente
Justo e verdadeiro, tudo suporta e tudo crê

Tão puro e perfeito
Não busca interesse ou favor
Mistério, expressão e vida é o amor

(...)

Se não tivesse amor, de nada valeria
Se não tivesse amor, proveito algum teria
Fria e sem razão, a vida então passaria

(...)

Se não tivesse amor
Eu nada seria"

João Alexandre

Ao João, pelo amor, amizade, companhia e paciência em todos esses anos de namoro.

Você é muito importante na minha vida, e cada dia ao seu lado é muito especial para mim.

Se não fosse você, eu não seria quem sou, e apesar das nossas diferenças, eu te amo muito!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, pela minha vida, pela minha família, pelo meu namorado, pelos meus amigos, por todas as oportunidades que me proporcionou, e pela força que Ele me deu em todos os momentos da minha vida, pois se não fosse a minha fé em Deus, eu já teria desistido de seguir meu caminho a muito tempo!

Aos meus pais, Luiz e Áurea, por tudo que fizeram até hoje por mim, desde o "paitrocínio" até as massagens relaxantes de minha mãe, fazendo com que eu chegasse, "firme e forte" até aqui!

Ao meu namorado João, por todos os anos maravilhosos que já passamos juntos, e pelo seu amor, amizade, carinho e "paciência" em muitos momentos!

Aos meus irmãos Paty, Lucy e Luizinho pelas conversas, brigas, amizade e por todos os momentos de alegria em que demos risadas e pelos momentos de tristezas que compartilhamos, fazendo com que ficássemos cada vez mais unidos!

Às minhas sobrinhas Yasmin e Tayná e ao meu sobrinho Lucas por todos os momentos de alegria que já me proporcionaram, e que com um simples "Oi tia Déia", me faziam esquecer os mais difíceis problemas.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Helena Matté pela forma maravilhosa que orientou este trabalho e também pela amizade que conquistamos em todos esses anos de convívio, tornando-se muito mais que uma orientadora, e sim uma amiga para todas as horas e até mesmo, uma segunda mãe.

À amiga Sosô (Dra. Solange Martone Rocha), por todas as conversas, pelas dicas valiosas que me deu tanto profissional,

quanto pessoal, pela companhia e as longas conversas no camarote da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) e além disso, por todas as referências bibliográficas!!

À amiga Marisa Morita pela companhia em todas as disciplinas do mestrado, pela ajuda nas extrações de DNA, por todos os relatórios, cartas de encaminhamento, planos de estudo, cronogramas e projetos que fizemos juntas para obter e manter a nossa bolsa de mestrado do CNPq, e além disso, por todos os momentos divertidos que passamos nesses anos de convívio.

À amiga Milena Dropa por todo o auxílio na parte prática, além da amizade e das muitas risadas que demos, tornando o meu mestrado muito mais agradável.

Às amigas Melissa Vallin de La Torre e Paula Di Pierro que sempre estiveram ao meu lado vibrando junto comigo à cada conquista e me apoiando nos momentos difíceis, desde os tempos da graduação.

À TODOS VOCÊS, MEU MUITO OBRIGADA, SE NÃO FOSSEM POR VOCÊS, MINHA VIDA NÃO TERIA A MENOR RAZÃO DE SER! VALEU MESMO!!!

"E nossa história não estará pelo avesso assim sem final feliz
Teremos coisas bonitas pra contar, e até lá
Vamos viver, temos muito ainda por fazer
Não olhe pra trás, apenas começamos
O mundo começa agora, apenas começamos."

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Saúde Pública da USP e ao Laboratório de Prática de Saúde Pública pelo espaço concedido para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários de Departamento de Prática de Saúde Pública, por todo auxílio dado durante a realização deste trabalho, em especial à Prof. Dra. Nicolina Silvana Romano Lieber.

Ao Prof. Dr. Glavur Rogério Matté pelo apoio na parte burocrática do mestrado e pelas valiosas correções da dissertação.

Aos funcionários da pós-graduação, que sempre me auxiliaram com presteza, em especial à Ângela Maria Pereira Silva.

Aos funcionários da biblioteca pelas referências bibliográficas.

Ao Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública, pelo fornecimento de água MilliQ, fundamental para a execução da parte prática deste trabalho.

À CETESB, em especial à Dra. Maria Inês Zanoli Sato, pelo fornecimento dos Índices de Qualidade de Água, utilizados neste trabalho.

Ao CNPq e à Comissão de Bolsas da Faculdade de Saúde Pública pelo auxílio financeiro concedido.

À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido na primeira etapa deste trabalho.

Ao CECOVISA/USP - Centro Colaborador em Vigilância Sanitária/FSP. Convênio CA nº 06/99 – 44 – ANVSMS – processo nº 2001.1.1048.6.9, pelo apoio prestado como parte dos projetos de desenvolvimento tecnológico e de recursos humanos através da pós-graduação stricto sensu.

Ao Prof. Dr. Délsio Natal, por ter me indicado ao Laboratório de Prática de Saúde Pública e pelas valiosas informações concedidas, durante a realização da disciplina de Epidemiologia.

Ao amigo Iscoti (Alexandre Camargo) do Instituto Biológico da USP pela amizade e pelas informações sobre o PETAR.

Ao Dr. Leandro Luiz Giatti da Faculdade de Saúde Pública e ao Sr. Hélio Shimada pelas valiosas informações sobre o PETAR.

Aos estagiários do laboratório: Luciana (Loló), Thiago, Martha e Karla por todo apoio durante a execução da parte prática deste trabalho, além da amizade e dos momentos alegres que passamos no laboratório.

Às "meninas do laboratório": Agnes, Ana Maria, Fernanda (Fê), Lucia, Márcia, Maria Tereza, Marisa, Milena, Mirian, Mônica, Rita, Rosinha, Solange, Suzi, Suzete, Therezinha, Vandréa, Vera e Viraneide, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, além de terem tornado o nosso convívio muito mais divertido.

À Maria do Carmo e à Silvana, do Departamento de Saúde Ambiental, pela amizade que conquistamos nesses anos de convivência.

À todas as pessoas que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Cabral A. **Diversidade e perfil plasmidial de bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo.** São Paulo. 2004 [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Introdução: O gênero *Aeromonas* é ubiqüitário no ambiente aquático e já foi isolado de água doce, salgada, salobra, mineral, poluída ou tratada. Várias espécies de *Aeromonas* apresentam fatores de virulência e podem estar relacionadas a uma série de doenças para seu hospedeiro. **Objetivo:** Estudar a diversidade e caracterizar molecularmente através do perfil plasmidial, as diferentes espécies do gênero *Aeromonas* provenientes de corpos hídricos de São Paulo. **Métodos:** Foram coletadas 19 amostras de água, sendo 11 amostras de água doce, 1 de água salobra e 7 de água salgada. As amostras foram concentradas através de membrana filtrante e enriquecidas em 100mL de água peptonada alcalina 1%. As amostras foram estriadas em placas de petri contendo diferentes meios de cultivo. As colônias típicas foram submetidas a provas bioquímicas para a identificação das espécies. Foi feito o levantamento bibliográfico do Índice de Qualidade de Água (IQA) na CETESB, dos pontos de coleta analisados. Para a análise do perfil plasmidial, foi utilizada a metodologia descrita por BIRNBORN e DOLY (1979). **Resultados:** As espécies de *Aeromonas* foram isoladas em 84,2% dos ambientes isolados; segundo os dados da CETESB, 58,3% das amostras apresentaram condições favoráveis de qualidade de água; 43,2% das cepas isoladas apresentaram pelo menos um plasmídio. **Conclusões:** Concluiu-se que esses organismos estão amplamente distribuídos no ambiente aquático e que as espécies de *Aeromonas* não apresentam o mesmo perfil plasmidial. Os organismos isolados dos ambientes estudados podem representar risco à saúde.

Descritores: *Aeromonas*, Diversidade, Ambientes Aquáticos, Perfil Plasmidial e Saúde Pública.

SUMARY

Cabral A. **Diversity and plasmidial profile of bacteria of the genus *Aeromonas* isolated from aquatic environments of State of São Paulo.** São Paulo. 2004 [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Introduction: The genus *Aeromonas* is ubiquous in the aquatic environment and was isolated from polluted or treated fresh water, salt and brackish waters, and mineral water. Many *Aeromonas* species produce virulence factors that may be responsible for the disease in the bacterial host. **Objective:** To study the diversity and to characterize by plasmidial profile different species of the genus *Aeromonas* isolated from water bodies in the State of São Paulo. **Methods:** There were collected a total of 19 water samples as follow: 11 fresh-water, 1 brackish water, and 7 salt water. Samples were concentrated by filtration and enriched in 100 mL of 1% Alcalin Peptone water. Bacteria were isolated in petri dishes containing different culture medium. Typical colonies were submitted to biochemical test for species identification. Data on Water Quality from the collection site was obtained from CETESB. Plasmidial profile was carried out according to the methodology described by Birnboin & Doly (1979). **Results:** *Aeromonas* species were isolated from 84.2% of the studied environments, according to data from CETESB, 58.3% of samples presented favorable water quality conditions, and 43,2% of isolated strains had at least one plasmid. **Conclusions:** It was observed that these organisms are widely distributed in the aquatic environments studied, and have diverse plasmidial profiles. Organisms isolated from these environments my pose a risk to public health.

Describes: *Aeromonas*, Diversity, Aquatic Environments, Plasmidial Profile and Public Health.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O gênero *Aeromonas*	3
1.1.1. Taxonomia	4
1.1.2. Ambientes de ocorrência	8
1.1.3. Produção de fatores de virulência e patogenia	14
1.1.4. Resistência à antibióticos	20
1.2. Caracterização Molecular	22
1.2.1. Análise do perfil plasmidial	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Caracterização da Área de Estudo	29
3.1.1. Região Metropolitana de São Paulo	29
3.1.2. Salto	31
3.1.3. São Bernardo do Campo	31
3.1.4. Vale do Ribeira	32
3.1.5. Litoral Norte e Sul	33
3.2. Índice de Qualidade da Água (IQA) e Balneabilidade dos Ambientes Estudados	34
3.2.1. Índice de Qualidade de Água (IQA)	35
3.2.2. Balneabilidade das Águas do Mar	35

3.3. Coleta das Amostras 38

3.4. Processamento das Amostras 38

3.4.1. Concentração e enriquecimento das amostras 38

3.4.2. Meios de cultivo 39

3.4.3. Isolamento e identificação das colônias 40

3.5. Caracterização Molecular das Cepas de *Aeromonas* 42

3.5.1. Armazenamento das Cepas de *Aeromonas* 42

3.5.2. Extração de DNA Plasmidial 42

4. RESULTADOS 45

4.1. Ocorrência de *Aeromonas* nos Ambientes Estudados 47

4.1.1. Isolamento de *Aeromonas* de acordo com as amostras 47

4.1.2. Espécies de *Aeromonas* isoladas de cada amostra estudada 50

4.1.3. Isolamento de *Aeromonas* de acordo com os meios de cultura empregados 52

4.2. Análise do Perfil Plasmidial 55

4.2.1. Perfil plasmidial de acordo com os pontos de amostragem 57

4.2.2. Perfil plasmidial das espécies 61

5. DISCUSSÃO 65

5.1. Qualidade da Água das Amostras Analisadas 65

5.1.1. Região metropolitana de São Paulo 65

5.1.2. Salto 66

5.1.3. São Bernardo do Campo 66

5.1.4. Vale do Ribeira 67

5.1.5. Litoral Norte e Sul 68

5.2. Ocorrência de *Aeromonas* nos Ambientes Estudados 68

5.2.1. Diversidade das espécies de *Aeromonas* isoladas nos ambientes estudados 75

5.3. Isolamento de *Aeromonas* de Acordo com os Meios de Cultura Empregados 77

5.4. Análise do Perfil Plasmidial de *Aeromonas* spp 79

6. CONCLUSÕES 84

7. RECOMENDAÇÕES 85

8. REFERÊNCIAS 86

ANEXOS

Anexo I – Meios de cultura e reagentes utilizados para a determinação de *Aeromonas* spp e para a extração do DNA plasmidial. I

LISTA DE QUADROS

Pág.

Quadro 1: Pontos de coleta, local de amostragem e tipo de amostra, coletados no presente estudo, São Paulo, 2000. 30

Quadro 2: Dados da qualidade de água de cada ponto de amostragem estudados, segundo a CETESB, São Paulo, 2000. 36

Quadro 3: Localização dos parâmetros físico-químico e amostras de água de São Paulo, coletados no período de dezembro de 1999 a julho de 2000, São Paulo. 46

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1: Características bioquímicas esperadas para as diferentes espécies de *Aeromonas*. 41

Tabela 2: Número e porcentagem de espécies do gênero *Aeromonas* isoladas de todas as amostras de água analisadas, São Paulo, 2000. 47

Tabela 3: Número e porcentagem de cepas de *Aeromonas* isoladas dos ambientes aquáticos estudados do Estado de São Paulo, 2000. 48

Tabela 4: Freqüência de isolamento das diferentes espécies de *Aeromonas* em amostras de diferentes ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, 2000. 51

Tabela 5: Número e porcentagem das diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, segundo os diferentes meios de cultura empregados, 2004. 53

Tabela 6: Freqüência de isolamento de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, segundo o meio de cultura utilizado, 2004. 55

Tabela 7: Número e porcentagem de cepas de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, quanto à presença e ausência de plasmídios de baixo peso molecular (abaixo de 23 kb), São Paulo, 2004. 56

Tabela 8: Freqüência de cepas de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, por ponto de amostragem, que apresentaram zero ou até 9 plasmídios de baixo peso molecular por cepa isolada, São Paulo, 2004. 59

Tabela 9: Número e porcentagem de cepas de Aeromonas isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, que possuem pelo menos um plasmídio de alto peso molecular, 2004. 60

Tabela 10: Freqüência de plasmídios de baixo peso molecular, observados em cada espécie de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, 2004.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1: Rio Pinheiros (a esquerda) e Rio Tietê (a direita), pontos coletados (amostras 1 e 2, respectivamente), na região metropolitana de São Paulo, 2000. 31

Figura 2: Pontos de coleta no Reservatório Billings (em vermelho), São Bernardo do Campo, 2000. 32

Figura 3: Pontos de coleta no Vale do Ribeira. Cavernas Água Suja e Santana localizadas no Núcleo Santana e rios Iporanga, Ribeira do Iguape e Betari, Vale do Ribeira – SP, 2000. 34

Figura 4: Localização das diferentes regiões de coleta dos pontos de água doce na figura obtida no site www.uniagua.org.br, preparado com base nos dados da CETESB para o ano de 2000. 37

Figura 5: Resumo das etapas realizadas para o processamento das amostras de água, São Paulo, 2000. 39

Figura 6: Número de cepas de *Aeromonas* isoladas dos ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, 2000. 49

Figura 7: Porcentagem de cepas de *Aeromonas* isoladas dos ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, 2000. 49

Figura 8: Número de espécies de *Aeromonas* observadas por ponto de amostragem estudado, São Paulo, 2000. 50

Figura 9: Porcentagem de cepas de *Aeromonas* isoladas nos meios de cultura utilizados, considerando as espécies identificadas e as que não tiveram uma posição taxonômica definida quanto à espécie, São Paulo, 2004. 52

Figura 10: Porcentagem das espécies isoladas dos ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, de acordo com o meio de cultura utilizado, considerando apenas as cepas identificadas, São Paulo, 2004. 54

Figura 11: Quantidade de cepas que apresentaram respectivamente 0,1,2,3,4,5,6,7,8 e 9 plasmídios de baixo peso molecular, São Paulo, 2004. 57

Figura 12: Quantidade de cepas de *Aeromonas* isoladas dos pontos de amostragem estudados, que apresentaram pelo menos um plasmídio de baixo peso molecular, São Paulo, 2004. 58

Figura 13: Espécies de *Aeromonas* isoladas dos ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, que apresentaram pelo menos um plasmídio de baixo peso molecular, 2004. 61

Figura 14: Perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas* isoladas dos pontos de amostragem estudados, obtidos através da metodologia descrita por Birnborn e Doly (1979), São Paulo, 2004. 63

Figura 15: Perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas* isoladas dos pontos de amostragem estudados, obtidos através da metodologia descrita por Birnborn e Doly (1979), São Paulo, 2004. 64

1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural essencial à vida. Embora abundante no território nacional, já apresenta sua qualidade comprometida, principalmente próximo aos grandes centros urbanos. O Brasil é um país privilegiado, pois ocupa o primeiro lugar entre as nações com a maior reserva de água doce do mundo (20% do total mundial, seguido pela antiga União Soviética com 11%, China com 5,7% e Estados Unidos com 3,8%) (PANETTA 2001).

A demanda de água pelo homem vem crescendo constantemente. Como causa deste fenômeno, pode-se citar o aumento da população mundial e, em especial, a concentração populacional nas cidades. A urbanização tem como conseqüência, o desenvolvimento das indústrias, para satisfazer as necessidades cada vez maiores dos habitantes das cidades.

O Estado de São Paulo, por ter sua capital nas cabeceiras de rios e às margens de reservatórios utilizados como mananciais de abastecimento público, apresenta um quadro bastante complexo no que se refere à disponibilidade e demanda de água, bem como sua qualidade.

Os agentes biológicos continuam sendo os fatores mais importantes de contaminação da água. As doenças de veiculação hídrica são transmitidas através da ingestão de água contaminada por microrganismos patogênicos, eliminados nas fezes do homem e/ou dos animais, notavelmente onde as condições de saneamento básico são precárias.

Vale enfatizar que, em saúde pública, a endemicidade das doenças de veiculação hídrica, em altos níveis, é extremamente prejudicial para o desenvolvimento da população, em especial, das crianças.

A maioria das infecções intestinais é assintomática, à medida que aumenta a idade do indivíduo acometido, a resposta imune aos agentes agressores vai se tornando cada vez mais evidente e, como conseqüência, ocorre uma diminuição na manifestação clínica da infecção (GERMANO e GERMANO 2001).

O estado de portador assintomático, que pode persistir por até semanas, é muito importante na epidemiologia das gastroenterites infecciosas, uma vez que a eliminação dos agentes patogênicos no ambiente propicia a contaminação da água e dos alimentos. De maneira que os indivíduos nessas condições, podem não adotar nenhuma precaução higiênica para evitar a contaminação ambiental, representando assim um grande perigo para a sociedade.

São muitas as doenças passíveis de serem adquiridas pela ingestão de água contaminada, bem como suas manifestações e repercussões em saúde pública. Cabe lembrar que, além das crianças com idade inferior a dois anos, são suscetíveis indivíduos idosos, e pessoas convalescentes e especialmente, os imunocomprometidos, como por exemplo os portadores do vírus HIV que causa a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

Segundo SCHOFIELD (1992), grande parte das intoxicações alimentares é provocada por espécies de bactérias não rotineiramente pesquisadas durante as investigações de surtos, dentre as quais destacam-se as pertencentes ao gênero *Aeromonas*.

Segundo RIVERA e MARTINS (1996), as excretas humanas são o principal veículo de propagação de uma ampla variedade de enfermidades transmissíveis, e esta contaminação tem comprometido os recursos hídricos disponíveis para o consumo humano.

1.1. O gênero *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* pertence à família *Aeromonadaceae* e consiste em uma coletânea de bacilos Gram-negativos, que podem ter forma cocóide ou bacilar, curvos ou retos, móveis quando possuírem flagelo polar, ou imóveis, com comprimento de 1 a 3,5 µm. Estes microrganismos possuem metabolismo oxidativo fermentativo, são catalase positivos e produzem a enzima citocromo oxidase. Podem crescer em ambientes com até 4% de cloreto de sódio, sendo comumente encontrados em ambientes aquáticos com baixas quantidades deste sal. A temperatura para seu crescimento varia de -1°C a 41°C. Os valores de pH para seu crescimento variam entre 5,5 a 9,0. Algumas cepas são hemolíticas quando cultivadas em ágar sangue, e em sua maioria, produzem citotoxinas, enterotoxinas, endotoxinas, adesinas, proteinases e quitinase (POPOFF 1984, COLWELL *et al.* 1986, VADIVELU *et al.* 1991, SINGH e SANYAL 1992, LOEWY *et al.* 1993, SINGH e SANYAL 1993, SINGH *et al.* 1993, HOLMES *et al.* 1996, HUYS *et al.* 1997, JANDA e ABBOTT 1998, HUYS *et al.* 2002, ESTEVE *et al.* 2003, HARF-MONTEIL *et al.* 2004a, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2004).

O grupo de organismos do gênero *Aeromonas* é ubiqüitário no ambiente aquático e já foram isolados de água doce, salgada, salobra, mineral, poluída e tratada (POPOFF 1984, COLWELL *et al.* 1986, HOLMES *et al.* 1996, HUYS *et al.* 1997, ESTEVE *et al.* 2003, HARF-MONTEIL *et al.* 2004a, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2004).

Algumas espécies de *Aeromonas*, móveis, estão relacionadas com diversos tipos de doenças no homem, como diarréia autolimitante e diarréia semelhante à colérica, infecção de pele e ouvido, e até mesmo casos de necrose e septicemia em pacientes com fatores predisponentes como cortes, perfurações, cirurgias e distúrbios imunológicos, ou em indivíduos que tiveram prévia exposição a ambientes contaminados, principalmente água e alimentos (CARNAHAN *et al.* 1991d, HOUSTON *et al.* 1991, ROLSTON *et al.* 1991, HAVELAAR *et al.* 1992, KUEH *et al.* 1992,

VADIVELU *et al.* 1995, ROSSI JR *et al.* 2000, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2004).

Várias espécies de *Aeromonas* apresentam fatores de virulência, ou seja, fatores que podem estar relacionados à produção de doença, como toxinas citolíticas, endopeptidases, proteinases, hemolisinas, enterotoxinas, leucocidinas, quitinases e adesinas, que de forma isolada ou combinada, podem trazer danos patogênicos para o hospedeiro, podendo ser peixe, anfíbio, réptil, ou até mesmo o homem (ALABI e ODUGBEMI 1990, KUEH *et al.* 1992, HAVELAAR *et al.* 1992, KIROV 1993, VADIVELU *et al.* 1995, RIVERA e MARTINS 1996, ESTEVE *et al.* 2003, HARF-MONTEIL *et al.* 2004a, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2004).

1.1.1. Taxonomia

O gênero *Aeromonas* inicialmente foi composto por três espécies, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, entretanto, levando-se em conta a existência de cepas com características bioquímicas atípicas, e baseando-se em estudos de biologia molecular, alguns autores propuseram novas espécies baseadas em características fenotípicas e genotípicas (POPOFF 1984).

Anteriormente, os organismos do gênero *Aeromonas* pertenciam à família *Vibrionaceae*, porém com o aumento do número de estudos desses organismos verificou-se as variações fenotípicas existentes, o que levou alguns autores a proporem uma nova classificação quanto à família, criando assim a família *Aeromonadaceae* (COLWELL *et al.* 1986).

A taxonomia clássica era dividida em 2 grupos principais: o grupo das cepas psicrófilas com crescimento de 22 a 28°C, composto pela *A. salmonicida* e o grupo das cepas mesófilas com crescimento de 36 a 37°C composto pelas espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* (POPOFF 1984).

Reavaliando a classificação de amostras de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* de diferentes origens, JOSEPH *et al.* (1988), verificaram algumas formas atípicas em relação às espécies previamente classificadas. Com base nessas observações os autores comentam a importância da correta identificação das espécies deste gênero.

ABBOTT em 1992 propôs uma nova classificação baseada nas características bioquímicas e também com base nas provas de biologia molecular, e subdividiu o grupo das *Aeromonas* em 13 genoespécies organizados em 4 fenoespécies ou complexos: *A. hydrophila*, *A. salmonicida* e *Aeromonas* HG2 (Grupo de Hibridização número 2), pertenceriam ao complexo da *A. hydrophila*. As espécies *A.* caviae, *A. media* e *A. eucrenophila* pertenceriam ao complexo *A. caviae*. As espécies *A. sobria*, *A. veronii* biovariedade *sobria*, *A. jandaeii*, *A. veronii* biovariedade *veronii* e *Aeromonas* HG11, pertenceriam ao complexo *A. sobria* e por fim, as espécies *A. schubertii* e *A. trota* pertenceriam ao complexo *A. schubertii-trota*.

Posteriormente, quatro novas espécies foram introduzidas ao grupo das *Aeromonas*: *A. allosaccharophila*, descrita por MARTINEZ-MURCIA *et al.* (1992); *A. encheleia* descrita por ESTEVE *et al.* (1995); *A. bestiarum*, descrita por ALI *et al.* (1996) e *A. popoffii*, descrita por HUYS *et al.* (1997).

Atualmente, existem dezessete espécies de *Aeromonas* descritas e validadas a saber: *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. media*, *A. encheleia*, *A. allosaccharophila*, *A. eucrenophila*, *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. veronii* biogrupo *sobria*, *A. veronii* biogrupo *veronii*, *A. schubertii*, *A. jandaeii*, *A. trota*, *A. popoffii*, *A. simiae*, *A. culicicola* e *A. molluscorum*. (POPOFF 1984, COLWELL *et al.* 1986, HICKMAN-BRENNER *et al.* 1987, HICKMAN-BRENNER *et al.* 1988, SCHUBERT *et al.* 1988, CARNAHAN *et al.* 1991a, CARNAHAN *et al.* 1991b, CARNAHAN *et al.* 1991c, CARNAHAN e JOSEPH 1991, HUSSLEIN *et al.* 1991, MARTINEZ-MURCIA *et al.* 1992, ESTEVE *et*

al. 1995, ALI *et al.* 1996, HUYS *et al.* 1997, PIDIYAR *et al.* 2002, HARF-MONTEIL *et al.* 2004a, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2004).

Aeromonas veronii biovariedade *veronii* foi descrita quando HICKMAN-BRENNER *et al.* (1987), estudaram 9 cepas provenientes de pacientes, as quais não eram produtoras de arginina dehidrolase, e eram produtoras de lisina e ornitina descarboxilase. Esta cepa apesar da semelhança com o gênero *Vibrio* era mais relacionada geneticamente ao gênero *Aeromonas* e diferia fenotipicamente de *V. cholerae* e *V. mimicus* pela produção de gás, resistência à ampicilina e à carbenicilina. Esta espécie foi denominada primeiramente *A. veronii.*

Aeromonas schubertii foi descrita em 1988, por HICKMAN-BRENNER *et al.*, quando receberam uma cepa parecida com o *Vibrio damsela*, porém não necessitava de NaCl para crescimento. Após a realização de testes bioquímicos e genéticos, determinaram que se tratava de uma nova espécie de *Aeromonas.*

SCHUBERT *et al.* (1988), descreveram *Aeromonas eucrenophila* e através de testes, verificaram que esta não é uma espécie patogênica para mamíferos. A espécie em questão é encontrada normalmente em água limpa, na superfície e no fundo. Esta espécie cresce em temperaturas de 0 a 37 °C e em pH que varia de 5,5 a 9,0 (CARSON *et al.* 2001, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2002, VALERA e ESTEVE 2002, ESTEVE *et al.* 2003).

CARNAHAN *et al.* (1991a), propuseram uma chave de identificação de espécies de *Aeromonas*, baseadas em provas bioquímicas, onde consideraram dois subgrupos de *A. veronii*: *A. veronii* biovariedade *sobria*, usualmente denominada como *A. veronii sobria* e *A. veronii* biovariedade *veronii*, denominada atualmente como *A. veronii veronii* (HUYS *et al.* 1997, ESTEVE *et al.* 2003). Mesmo assim, alguns autores não passaram a chamar *A. sobria* de *A. veronii sobria*, sendo esta segunda a

nomenclatura correta desses organismos, uma vez que foi observado que pertencem ao mesmo grupo.

Há alguns anos atrás, *Aeromonas trota* era considerada a única espécie do gênero *Aeromonas* que era sensível ao antibiótico ampicilina (CARANAHAN *et al.* 1991b), porém mais tarde, alguns autores isolaram cepas dessa espécie em meios contendo antibióticos, embora essa seja a mais sensível do gênero à antibióticos (HASSANI *et al.* 1992).

Aeromonas encheleia foi descrita em 1995, por ESTEVE *et al.* quando trabalhavam com 4 cepas isoladas de enguias. Foi realizada uma série de testes para a pesquisa de fatores de virulência, cujos resultados demonstraram que a patogenicidade deste organismo é baixa apesar de terem sido isoladas de enguias (HUYS *et al.* 1997, ESTEVE *et al.* 2003).

HUYS *et al.* (1997), ao estudarem 7 cepas semelhantes à *A. bestiarum*, verificaram depois de vários testes, que se tratava de uma nova espécie, a qual foi denominada de *A. popoffii*.

Aeromonas culicicola foi descrita por PIDIYAR *et al.* (2002), em um estudo com mosquitos *Culex quinquefasciatus*. Os mosquitos foram capturados e tiveram seus intestinos dissecados sob condições estéreis, e suspensos em solução salina estéril 0,85%. A solução foi estriada em ágar sangue e colônias típicas de *Aeromonas* foram identificadas depois de inúmeros testes, como sendo uma nova espécie.

Aeromonas simiae foi isolada pela primeira vez das fezes de dois macacos saudáveis (*Macaca fascicularis*) no Centro de Primatologia em Strasbourg, na França. Durante a realização de testes rotineiros no trato intestinal dos macacos, para a pesquisa de possíveis patógenos, duas cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas* foram isoladas, e depois de vários testes, os autores concluíram que se tratava de uma nova espécie (HARF-MONTEIL *et al.* 2004a).

Aeromonas molluscorum foi descrita por MIÑANA-GALBIS *et al.* (2004). Os autores isolaram 5 cepas de *Aeromonas* de moluscos bivalves encontrados na Espanha. Por não se tratar de nenhuma espécie já definida, os autores utilizaram para o estudo, a relação das cepas com as espécies cujas pesquisas sobre a hibridização de DNA estavam previamente concluídas, e verificaram que as 5 cepas se tratavam de uma nova espécie.

1.1.2. Ambientes de ocorrência

Os organismos do gênero *Aeromonas* têm ampla distribuição em vários tipos de ambientes, podendo ser encontrados em: água doce (clorada ou não), salobra e salgada, limpa ou poluída, água mineral, e até em alimentos, mesmo mantidos sob refrigeração (HAVELAAR *et al.* 1990, MORGAN *et al.* 1991, KUEH *et al.* 1992, KIROV 1993, VADIVELU *et al.* 1995, FERNÁNDEZ *et al.* 2000, SZABO *et al.* 2000, CARSON *et al.* 2001, McMAHON e WILSON 2001, HARF-MONTEIL *et al.* 2004a).

Sua grande distribuição em diversificados ambientes deve-se à sua alta capacidade de adaptação aos diferentes ambientes, além de sua fácil multiplicação, independentemente de algum hospedeiro. Esses microrganismos possuem grande facilidade de sobreviver em diferentes tipos de ambiente e constituem a microbiota das águas superficiais. O ciclo fecal-oral pode contribuir para o aumento do número de bactérias no ambiente, entretanto este número é determinado muito mais por fatores ecológicos do que por contaminação (KHARDORI e FAINSTEIN 1988, KIROV 1993, MATEOS *et al.* 1993, CARSON *et al.* 2001, NAYDUCH *et al.* 2001, HARF-MONTEIL *et al.* 2004).

Estudos recentes mostram que *Aeromonas* pode ser encontrada na água potável, clorada ou não. O estudo feito nesse tipo de água é de grande importância do ponto de vista epidemiológico e de Saúde Pública, uma vez que pode causar contaminação no homem, provocando diarréia. As espécies mais encontradas em água potável são: *A. hydrophila,*

A. veronii sobria e *A. caviae* (HAVELAAR *et al.* 1992, HUYS *et al.* 1995, MIRANDA e CASTILLO 1998, ROSSI JR *et al.* 2000, CHAURET *et al.* 2001).

1.1.2.1. Ocorrência de *Aeromonas* spp no ambiente aquático

A água poluída tem grande importância no estudo de *Aeromonas* spp, pois pode representar uma fonte de contaminação para as águas superficiais que são utilizadas para fins recreacionais. A presença deste microrganismo é favorecida pelo conteúdo de matéria orgânica presente na água, podendo levar uma sobrevivência maior em águas poluídas e com descarga de esgotos (MONFORT e BALEUX 1990, HAVELAAR *et al.* 1992, KUEH *et al.* 1992, KIROV 1993, MATTÉ 1995, VADIVELU *et al.* 1995, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2002).

Aeromonas allosaccharophila já foi isolada do meio ambiente e de amostras clínicas, de humanos e também de enguias (MARTINEZ-MURCIA *et al.* 1992, HUYS *et al.* 1997, ESTEVE *et al.* 2003).

KIROV (1993) relata que a principal fonte de infecção de *Aeromonas* é a água, onde ocorre em altas concentrações, mesmo em águas cloradas; e mostra também que existe a possibilidade de ocorrência de espécies de *Aeromonas* em alimentos, mesmo sob refrigeração. Algumas espécies, incluindo as enteropatógenas, são capazes de crescer rapidamente a 5 °C, significando que a refrigeração pode não ser suficiente para controlar o crescimento de espécies potencialmente patogênicas.

BAHLAOUI *et al.* (1997) analisaram a dinâmica de indicadores de poluição e bactérias patogênicas em lagoas de oxidação e verificaram que o gênero *Aeromonas* apresentou maior complexidade do que os coliformes fecais. Os autores enfatizaram que do ponto de vista sanitário o sistema de lagoa de oxidação foi mais eficiente para eliminação de microrganismos fecais do que para as demais bactérias patógenas estudadas.

KUHN *et al.* (1997) analisando a diversidade, persistência e virulência de *Aeromonas* isoladas em 13 sistemas de tratamento de água (ETA) na Suécia, relataram que embora diferentes cepas de *Aeromonas* possam estar presentes no sistema de distribuição, poucas foram capazes de persistir e se multiplicar no sistema, mas que essas poucas cepas possuíam fatores de virulência, considerando assim, um problema de saúde pública.

RAZZOLINI (1998) estudou caixas d'água e bebedouros no município de São Paulo e constatou a presença de cepas *Aeromonas*, sugeriu a necessidade do desenvolvimento de campanhas educativas quanto à importância da vigilância sanitária da qualidade da água.

GAVRIEL *et al.* (1998) examinando 31 sistemas de distribuição de água no nordeste da Escócia, demonstraram claramente que *Aeromonas* podem permanecer nos reservatórios com níveis de cloro de até 0,45 mg/L^{-1}, e que fatores como temperatura e presença de matéria orgânica na água têm uma importante influência no controle desses organismos.

FALCÃO *et al.* (1998), ao estudar a prevalência de espécies de *Aeromonas* em Araraquara – SP, constataram em um rio (50%), seguido pela água de irrigação (33,4%) e por reservatórios (16,6%). Os autores alertam que os dados do estudo sugerem que estas águas podem ser fontes de infecção quando utilizadas na irrigação de vegetais, como também representam um risco potencial de agravos à saúde pelo fato desses organismos apresentarem fatores de virulência.

Em 1999, HIROTANI *et al.*, fizeram uma correlação entre *A. hydrophila* com bactérias indicadoras de poluição. Os autores consideraram que os fatores controladores de *A. hydrophila* foram a temperatura e índices pluviométricos e sua presença no ambiente estudado não estava associada à contaminação humana.

Em um estudo de caracterização de espécies de *Aeromonas* e *Vibrio* em águas coletadas em um reservatório na Rússia, IVANOVA *et al.* (2001) observaram que as espécies mais abundantes foram *A. sobria* e *A. popoffii*, as quais são freqüentemente isoladas em águas com poluição fecal.

Nos últimos anos o aumento da atenção em relação a *Aeromonas* spp tem sido associado a infecções entéricas, como relata MASSA (2001) que estudou a presença desse microrganismo em água mineral e água de poço. Neste trabalho o autor não encontrou nenhuma espécie de *Aeromonas* na água mineral, mas em 5 dos 20 poços analisados, foi detectada a presença dessa bactéria. Relata também que o grupo *Aeromonas* pode ser considerado um bom indicador da qualidade higiênica da água de poço.

MESSI *et al.* (2002) analisaram *A. hydrophila* em água mineral na Itália, por se tratar de uma espécie resistente ao cloro, e concluíram que esta espécie pode persistir por período relativamente longo (150 dias) neste meio e sugerem a necessidade de avaliar este produto.

Aeromonas popoffii foi relatada pela primeira vez na água do mar por SOLER *et al.* (2002). Os autores salientam que todas as cepas de *Aeromonas popoffii* encontradas eram β-hemolíticas e resistentes a ampicilina.

Mais recentemente espécies de *Aeromonas* foram isoladas no Continente Antártico por MATTÉ (2004), onde a temperatura da água variou entre -1 °C a 4 °C confirmando assim sua ampla distribuição e sua capacidade de sobreviver em extremos de temperatura.

1.1.2.2. Ocorrência de *Aeromonas* em outros ambientes

HAVELAAR *et al.* (1992), estudando cepas de *Aeromonas* de origem clínica (isoladas de pacientes com diarréia), bem como de água tratada, verificaram que tanto na água quanto nas fezes humanas *A. caviae* foi mais freqüente; enquanto que *A. hydrophila* foi mais freqüente na água. Relatam, que embora a presença de *Aeromonas* spp na água tratada tenha sido rara, não se deve deixar de considerar sua presença.

A sobrevivência de *A. hydrophila, A. caviae* e *A. sobria* no solo foi avaliada por BRANDI *et al.* (1996), que verificaram que todas as cepas analisadas não só foram capazes de se multiplicar, mas sobreviver por longos períodos de tempo, como também mantiveram fatores de virulência. Os mesmos autores alertam para a possibilidade desses microrganismos serem transmitidos indiretamente (contaminação das mãos, vegetais e água) ou diretamente (feridas) para indivíduos susceptíveis; sugerem que o solo pode representar um importante reservatório das espécies estudadas.

Examinando a superfície das mãos de manipuladores de carne bovina em um matadouro do Estado de São Paulo, ROSSI JÚNIOR *et al.* (2000), evidenciaram amostras contaminadas pelo gênero *Aeromonas*.

McMAHON e WILSON (2001) investigaram a ocorrência de patógenos entéricos e espécies de *Aeromonas* em vegetais orgânicos comercializados na Irlanda do Norte. Os pesquisadores observaram a ausência de *Salmonella, Campylobacter, E. coli, E. coli* O 157 e Listeria nas amostras analisadas. Porém os autores evidenciaram que 34% das amostras de vegetais orgânicos apresentaram espécies do gênero *Aeromonas*. Os autores observaram também que espécies de *Aeromonas* foram encontradas em 34% das amostras. As espécies mais encontradas foram *A. schubertii* em 21% das amostras, 5,8% de *A. hydrophila*, 5,8% de *A. trota*, 3,5% de *A. caviae* e 2,3% de *A. veronii* biovariedade *veronii*. Os vegetais analisados foram: cenoura, cogumelo, tomate, tomate cereja,

cebola, batata, pimentão, abobrinha, aspargos e agrião.

NAYDUCH *et al.* (2001), estudaram o papel da mosca doméstica (*Musca domestica*) na transmissão e veiculação de patógenos. Investigando a prevalência de *Aeromonas* em moscas coletadas em fazendas e em um restaurante da Carolina do Sul nos Estados Unidos detectaram *A. caviae* em 78% das moscas provenientes do gado leiteiro e 39% do restaurante. Os autores enfatizam que o modo mais comum de transmissão desse organismo tem sido por via fecal-oral, possivelmente por ingestão de água contaminada, mas que sua ampla distribuição na natureza e na agricultura sugerem um potencial de outros meios de transmissão. Relatam ainda que alguns alimentos do estudo eram armazenados em lugar fresco (temperatura adequada) e outros no freezer ou geladeira, consideraram ainda que, algumas espécies de *Aeromonas* são psicotróficas, e que não somente sobrevivem, como também crescem nestes ambientes, concluindo que independentemente da fonte de contaminação, *A. caviae* tem significativa implicação epidemiológica.

BULHÕES *et al.* (2002) investigando queijos minas frescal tipo artesanal observaram a presença de *A. caviae, A. hydrophila* e *A. schubertii*, e ainda que 51,2% das amostras estavam contaminadas por estes microrganismos com concentrações que variaram de $5,0 \times 10^3$ a $4,0 \times 10^5$ UFC/grama. Concluíram que estes resultados devem servir de alerta aos serviços de saúde pública.

GRASSI *et al.* (2003), analisaram amostras de carne bovina e eqüina, de aves e peixe e detectaram *Aeromonas* em 75%. Dentre as espécies isoladas, 80% foi identificada como *A. hydrophila* e *A. caviae* e 20% como *A. sobria*.

1.1.3. Produção de Fatores de Virulência e Patogenia

Pela variedade de formas de infecção que espécies do gênero *Aeromonas* podem apresentar, estas têm merecido constante atenção de pesquisadores, quanto a fatores que possam estar relacionados à produção de doença. Dentre estes fatores podem ser citadas toxinas citolíticas, endopeptidases, proteinases, hemolisinas, enterotoxinas, leucocidinas, quitinases e adesinas, entre outros, que de forma combinada ou isolada podem produzir uma gama de efeitos patogênicos para o hospedeiro (ALABI e ODUGBEMI 1990, MONFORT e BALEUX 1991, MATEOS *et al.* 1992, JANDA *et al.* 1996, BRANDI *et al.* 1996, RALL *et al.* 1998).

A hemorragia é um fator evidente nas infecções dos animais ectodérmicos, causada por *Aeromonas*, conhecida como doença "red leg" (doença da perna vermelha) (MATTÉ 1995). No homem esse tipo de doença recebe o nome de infecção dos tecidos moles ou celulite. A produção de hemólise observada quando cepas de *Aeromonas* são inoculadas em ágar sangue é uma prova indicativa de que este microrganismo é produtor de hemolisina e, portanto, pode ser considerado um patógeno potencial (ASAO *et al.* 1988, KHARDORI e FAINSTEIN 1988, HOUSTON *et al.* 1991, SINGH e SANYAL 1992, SINGH *et al.* 1993, SINGH e SANYAL 1993, MATTÉ 1995).

Com a diferenciação de espécies de *Aeromonas* pesquisadores vêm estudando fatores de virulência produzidos por cepas obtidas de amostras ambientais e clínicas, de forma isolada ou em conjunto, procurando estabelecer a relação entre tipos de toxina e patogenicidade, que normalmente está associada principalmente a dois fatores: aderência às células e produção de toxinas.

O gênero *Aeromonas* tem sido responsabilizado como agente causador de doenças em diversas espécies de animais como peixes, anfíbios, répteis e mamíferos, incluindo o homem que sofre uma variedade

de doenças (DEODHAR *et al.* 1991, ASHDOWN e KOEHLER 1993, DAVIS e STIRLING 1993, GREY e KIROV 1993, KIROV 1993, MATTÉ 1995).

As espécies do gênero *Aeromonas* estão relacionadas com diversos tipos de doenças no homem sendo a principal delas a diarréia autolimitante e, ainda, formas severas similares à diarréia colérica. Em menor proporção aparece relacionada à infecção de pele, ouvido, casos de necrose e septicemia, envolvendo pacientes portadores de fatores predisponentes como cortes, perfurações, abrasões, cirurgias e distúrbios imunológicos em indivíduos que tiveram prévia exposição a ambientes contaminados, principalmente água e alimentos (HOUSTON *et al.* 1991, ROLSTON *et al.* 1991, HAVELAAR *et al.* 1992, KUEH *et al.* 1992, MATTÉ 1995, VADIVELU *et al.* 1995).

Os fatores de virulência das espécies *A. salmonicida*, *A. hydrophila* e A. veronii sobria, estão mais associadas à aderência nas células do hospedeiro (HOKAMA e INAGAWA 1991, HO *et al.* 1992). As citotoxinas e enterotoxinas (incluindo aquelas com atividades hemolíticas), são as mais importantes para sua patogenicidade (MERINO *et al.* 1992, 1995). *Aeromonas* também podem produzir proteases, amilases, quitinases, lípases e nucleases (JANDA 1991).

Alguns autores reconhecem as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* como os primeiros patógenos para humanos (JANDA 1991, PALUMBO *et al.* 1992). As infecções mais comuns associadas com essas espécies são as gastroenterites, diarréia, peritonite, endocardite, septicemia e feridas infecciosas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (DELBEKE *et al.* 1985, ROLSTON *et al.* 1991, BRANDI *et al.* 1996).

Aeromonas hydrophila é uma espécie potencialmente patogênica (CARNAHAN *et al.* 1991d), produz enterotoxinas e citotoxinas, além de enzimas citolíticas e hemolíticas (KIROV 1993). Normalmente *A.*

hydrophila é encontrada em água limpa e em água contaminada por esgoto, e quando em contato com a pele pode causar feridas, infecções ou diarréia, septicemia e até mesmo a morte quando ingerida (HAVELAAR *et al.* 1992, KUEH *et al.* 1992, VADIVELU *et al.* 1995, HUYS *et al.* 1997, 2002, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2002, VALERA e ESTEVE 2002).

SINGH e SANYAL (1992), em um estudo envolvendo cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* provenientes de amostras clínicas e ambientais, procuraram estabelecer a correlação entre a produção de hemólise e a enterotoxigenicidade das cepas. Observaram que a maioria das cepas de *Aeromonas* estudada produzia β-hemólise, sendo que *A. caviae* foi hemolítica nas mesmas proporções que *A. hydrophila* e *A. sobria*.

Os organismos do gênero *Aeromonas* pode ser um importante veículo para as infecções intestinais humanas, quando pacientes imunocomprometidos ingerem água ou alimentos contaminados. Além disso, esses pacientes quando expostos à ambientes contaminados, podem ocorrer feridas cutâneas infecciosas (BRANDI *et al.* 1996).

SECHI *et al.* (2002), estudaram 46 cepas de *Aeromonas*, sendo 26 de *A. hydrophila*, 13 de *A. sobria* e 7 de *A. salmonicida*, isoladas de amostras de água e amostras clínicas em Sardenha na Itália. Os autores concluíram que essas espécies possuem hemolisinas, proteinases e são produtoras de gelatinase, sendo que essas toxinas foram mais comuns nas cepas isoladas de amostras clínicas.

Alguns autores, ao estudarem os organismos do gênero *Aeromonas*, determinaram que *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii veronii*, *A. veronii sobria*, *A. trota*, *A. schubertii*, possuem fatores de virulência por serem β-hemolíticas (NEVES *et al.* 1990, CARNAHAN *et al.* 1991b, HUSSLEIN *et al.* 1991, KOKKA *et al.* 1992, SINGH e SANYAL 1992, GREY e KIROV 1993, GOSLING *et al.* 1993, BRANDI *et al.* 1996).

DAILY *et al.* (1981), estudaram as características de 15 cepas de *Aeromonas* isoladas de material de diferentes infecções humanas e 9 cepas isoladas de amostras de água poluída. Após testes bioquímicos, os autores concluíram que *A. sobria* era mais freqüentemente associada com infecções humanas enquanto que *A. hydrophila* estava mais associada às amostras ambientais.

A. schubertii já foi isolada de feridas, pele, fluído pleural, sangue, entre outras amostras clínicas. Esta é uma espécie considerada potencialmente patogênica (CARANAHAN *et al.* 1989, HUYS *et al.* 1997, ESTEVE *et al.* 2003).

A. trota, normalmente é encontrada em amostras clínicas. É potencialmente patogênica, pois possui enzimas hemolíticas, citolíticas e proteolíticas (CARNAHAN *et al.* 1991b, HUYS *et al.* 1997, ESTEVE *et al.* 2003).

Aeromonas salmonicida é uma espécie imóvel, comumente isolada de amostras ambientais sendo responsável por doenças em peixes. Esta espécie não está relacionada a doenças em humanos apesar de ser potencialmente patogênica (MORGAN *et al.* 1991, MORGAN *et al.* 1993, ESTEVE *et al.* 2003, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2002, 2004).

Aeromonas caviae tem sido isolada de amostras clínicas, porém já foi isolada de amostras ambientais (MONFORTE e BALEUX 1991). É oportunista, porém, potencialmente patogênica para o homem, e conhecida por causar diarréia em humanos (CARNAHAN *et al.* 1991a, HAVELAAR *et al.* 1992, KIROV 1993, RAUTELIN *et al.* 1995, CARSON *et al.* 2001, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2002, VALERA e ESTEVE 2002).

Aeromonas veronii biovariedade *sobria* já foi isolada tanto de ambiente quanto de amostras clínicas. Alguns autores comprovaram que é potencialmente patogênica por possuir enzimas hemolíticas e citolíticas

(MONFORT e BALEAUX 1991, SINGH e SANYAL 1992, MATTÉ 1995, CARSON *et al.* 2001, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2002, VALERA e ESTEVE 2002).

Aeromonas jandaeii já foi isolada de amostras humanas e ambientais, sendo que os casos clínicos eram de pacientes que apresentavam fatores predisponentes (CARANAHAN *et al.* 1991c, CARSON *et al.* 2001). MATTÉ (1995) isolou um grande número de *A. jandaeii* em amostras de água da represa Guarapiranga em São Paulo, o que nunca havia ocorrido até então. Em testes realizados para pesquisa de fatores de virulência nos isolados, MATTÉ (1995) comprovou o alto potencial de patogenicidade de *A. jandaeii*, por possuir enzimas citolíticas e hemolíticas.

MORENA *et al.* (1993), estudaram dois surtos de diarréia causados por organismos enteropatogênicos ocorridos em crianças no Texas, EUA. No primeiro surto, isolaram *Aeromonas* spp em 24% das crianças contaminadas e no segundo surto, em 21% delas. Concluíram que diferentes espécies de *Aeromonas* estavam envolvidas nos surtos, uma vez que alguns sintomas estavam associados à infecção por este microrganismos.

Aeromonas media já foi isolada tanto de amostras ambientais, quanto clínicas. RAUTELIN *et al.* (1995), isolaram *A. media* de um paciente após este ter sido infectado com *A. caviae*, porém após ter sido medicado, *A. media* não mais foi encontrada nas fezes desse paciente. CARSON *et al.* (2001) afirmam que *A. media* é menos comum em diarréias humanas, mas acreditam que pessoas com fatores predisponentes, podem sofrer tal infecção.

Durante um período de 17 meses, *A. caviae* foi isolada mais de 15 vezes das fezes de um indivíduo que desenvolveu uma diarréia crônica após viajar para a Turquia. Após uma terapia rigorosa com ciprofloxacina durante 4 semanas, o paciente não apresentou mais a infecção por esta

espécie. Porém 6 meses depois, uma cepa de *A. media* foi isolada das fezes deste mesmo paciente que mais uma vez foi submetido ao tratamento com o antibiótico utilizado anteriormente. Desde então, o paciente não apresentou mais os sintomas da infecção. Os autores inferiram que a diarréia crônica foi causada por uma única cepa de *A. caviae* (RAUTELIN *et al.* 1995).

Dois estudos realizados no Japão acompanharam dois pacientes com cirrose hepática devido ao alcoolismo. Deram entrada no hospital com fortes dores abdominais e febre alta. Após a cultura de amostras de endoscopia e sangue, revelaram a presença de *A. sobria*, cuja infecção causou a morte de um dos pacientes. De acordo com os autores a infecção por *A. sobria* em pacientes com cirrose é rara (KOHASHI *et al.* 1995, ITOH *et al.* 1999).

Aeromonas bestiarum já foi isolada tanto de amostras ambientais, incluindo animais (73%), como de amostras clínicas (27%), sendo que os indivíduos infectados apresentavam fatores predisponentes. Consideram esta espécie como potencialmente patogênica apesar de ser encontrada mais freqüentemente no ambiente do que em amostras clínicas (ALI *et al.* 1996, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2002).

BORRELL *et al.* (1998), identificaram *Aeromonas* spp em diferentes fontes clínicas e ambientais, e ressaltaram que a alta prevalência dessa bactéria patogênica pode ser considerada como uma importante ameaça para a saúde pública.

GIBOTTI *et al.* (2000), verificando a presença de *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* no rio Cambé no Estado do Paraná, discorrem que mesmo em ambientes não poluídos, foram isoladas espécies de *Aeromonas* e *Plesiomonas shigelloides*. Enfatizam que das *Aeromonas* isoladas, 45% eram hemolíticas indicando seu potencial de patogenicidade, bem como o risco para humanos, já que estas águas são utilizadas para irrigação, recreação e consumo por animais.

MINNAGANTI *et al.* (2000), descreveram o primeiro caso de fascite necrotizante causado por *Aeromonas hydrophila* não associada com pacientes imunocomprometidos ou com doença no fígado.

CLARK e CHENOWETH (2003), verificaram que espécies de *Aeromonas* podem causar infecções no sistema hepatobiliar e ocasionalmente no pancreático, e fazem um alerta a pacientes com problemas biliares ou que receberam transplantes, pois estes têm grandes chances de sofrerem contaminação por *Aeromonas*, ao ingerirem água ou alimentos contaminados.

HARF-MONTEIL *et al.* (2004b), estudaram os fatores de virulência de cepas de *A. caviae* isoladas de amostras clínicas. Os autores concluíram que esta espécie é patogênica para o homem pois possui fatores de virulência com enzimas hemolíticas e enterotoxinas.

SHAO *et al.* (2004), estudaram os efeitos de *A. hydrophila* sobre linfócitos de peixe (*Carassus auratus*) in vitro. Verificaram que *A. hydrophila* induz à apoptose nas células imunológicas do peixe, e com isso, inferiram que esta estratégia, descoberta recentemente, pode ser usada pela bactéria para a eliminação dos linfócitos do hospedeiro.

1.1.5. Resistência à antibióticos

Diversos autores estudaram a suscetibilidade de espécies de *Aeromonas* frente a antibióticos. De forma geral, os organismos do gênero *Aeromonas* apresenta-se resistente às penicilinas, com exceção de *A. trota* que pode ser sensível à ampicilina (CARNAHAN *et al.* 1991b, JOSEPH *et al.* 1991, GARCIA *et al.* 1992, GLUSKIN *et al.* 1992, MARTINEZ-MURCIA *et al.* 1992, CAILLEAUX *et al.* 1993, DAVIS e STIRLING 1993, MORENA *et al.* 1993, NEWTON e KENNEDY 1993, GONZALEZ *et al.* 1994, MORITA *et al.* 1994, McKEON *et al.* 1995, OVERMAN e JANDA 1999).

HASSANI *et al.* (1992), estudaram a resistência à antibióticos de cepas de *Aeromonas* isoladas de esgoto doméstico, antes e depois do tratamento. Os autores verificaram que todas as cepas foram resistentes à amoxilina e 73% foram resistentes à cefaloxina. Os autores relataram ainda que *A. sobria* é mais susceptível à antibióticos do que *A. hydrophila* e *A. caviae*.

ALONSO *et al.* (1996), estudaram a susceptibilidade à antibióticos de cepas de *Aeromonas* isoladas de água doce na Espanha, e concluíram que de todas as cepas de *Aeromonas* estudadas, 92% eram resistentes à cefaloxina.

MIRANDA e CASTILLO (1998) no Chile, pesquisaram a resistência de espécies de *Aeromonas* a antibióticos e metais pesados, demonstraram que quando os isolados eram provenientes de águas com alto índice de poluição, estes eram normalmente resistentes a pelo menos dois antibióticos.

OVERMAN e JANDA (1999), estudaram cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas provenientes da Califórnia e testaram a susceptibilidade de *A. jandaeii*, *A. schubertii*, *A. trota* e *A. veronii veronii* à antibióticos. Concluíram que 100% das cepas de *A. trota* eram sensíveis à ampicilina e 100 % de *A. schubertii* e *A. veronii veronii* e 88% de *A. jandaeii* eram resistentes à ampicilina.

URRIZA *et al.* (2000a), estudaram o impacto de efluentes urbanos sobre a resistência a antibióticos notaram que as enterobactérias foram sempre menos resistentes do que as cepas de *Aeromonas*.

Em outro estudo, URRIZA *et al.* (2000b), ressaltaram que tanto a presença de *Aeromonas* quanto a sua resistência a antibióticos está associada à densa população humana.

VIVEKANANDHAN *et al.* (2002), estudaram 319 cepas de *A. hydrophila* isoladas de peixes e camarões provenientes do Sul da Índia. Testaram todas as cepas para verificar sua resistência à antibióticos e concluíram que 100% delas foram resistentes à ampicilina, 99% foram resistentes à bacitracina e novobiocina e somente 3% mostraram resistência ao cloranfenicol. Inferiram que todas as cepas de *A. hydrophila* são fontes de grande risco para a população.

RADU *et al.* (2003), estudaram peixes da Malásia, e verificaram a presença de cepas de *Aeromonas*. Observaram que algumas espécies de *Aeromonas* eram resistentes a antibióticos. Relataram também, que embora a ocorrência de infecções por *Aeromonas* na Malásia não tenha sido documentada, alertam sobre a possibilidade da ameaça de infecção em países em que os peixes são ingeridos crus.

VILA *et al.* (2003), estudaram cepas de *Aeromonas* isoladas de pacientes com "diarréia do viajante" e concluíram que todas as cepas eram resistentes à ampicilina, algumas se mostraram resistentes à cloranfenicol, tetraciclina e outras eram susceptíveis à ciprofloxacina.

1.2. Caracterização Molecular

Atualmente, as moléculas de DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico) podem ser facilmente extraídas da célula, purificadas e analisadas, diferentemente de anos atrás, quando o DNA era a macromolécula mais difícil de ser analisada (BROCK *et al.* 1994, AUSUBEL *et al.* 1995, MATTÉ 2003).

A aplicação de métodos moleculares vem hoje substituindo os antigos métodos de avaliação de patogenicidade, que utilizavam modelos animais, permitindo que fosse determinada a toxicidade das culturas microbianas pela presença de vários fatores de virulência. Os métodos moleculares são mais acessíveis do ponto de vista financeiro e evitam

sacrifícios desnecessários dos animais de laboratórios (SINGH *et al.* 2001).

Os métodos genotípicos estão baseados na análise de duas moléculas (DNA e RNA) e oferecem várias vantagens pois, não é necessária uma identificação completa desses organismos pelos métodos fenotípicos, os fundamentos analíticos são sempre os mesmos e podem ser aplicados a qualquer amostra, e também porque muitos dos procedimentos são de simples realização (PERSING *et al.* 1993, MATTÉ 1996).

Os métodos fenotípicos convencionais dependem da expressão fenotípica de certas características bacterianas que podem ser variáveis; já os métodos moleculares permitem a observação direta dos genótipos, sendo que a aplicação desta tecnologia na área ambiental, clínica ou em estudos epidemiológicos proporciona interpretação com base em dados altamente reprodutíveis (MATTÉ 1996, MATTÉ 2003).

Nos últimos anos os avanços no campo da biologia molecular têm contribuído para o estudo da biodiversidade de microrganismos e da epidemiologia molecular (ABBOTT *et al.* 1992, MATTÉ 1996, JIANG *et al.* 2000, SINGH *et al.* 2001). O estudo do polimorfismo do DNA, total ou de regiões selecionadas do genoma, constitui uma alternativa muito útil na diferenciação entre indivíduos de uma mesma espécie, entre gêneros e para diferentes espécies (BUCHRIESER *et al.* 1995, MATTÉ 1996, IVANOVA *et al.* 2001).

Diversos métodos moleculares vem sendo empregados para genotipagem de microrganismos, a saber: Análise de Perfil Plasmidial, Digestão com Enzimas de Restrição (RFLP), Ribotipagem, Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), Hibridização com Sondas Genéticas, Polimorfismo a partir da Amplificação de Segmentos Específicos de DNA (AFLP), Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), Ribotipagem e Seqüênciamento (MATTÉ 1996, MATTÉ 2003).

1.2.1. Análise do Perfil Plasmidial

O termo plasmídio foi originalmente utilizado por LEDERBERG e LEDERBERG (1952) para descrever todos os determinantes extracromossômicos hereditários. Atualmente, este termo é usado só para designar DNA extracromossômico que se replica de forma autônoma (MATTÉ 1996).

Os plasmídios têm tamanho aproximado de 0,2 a 4,0% do DNA cromossômico com peso molecular variando entre 1 e 200 Kb. Estes elementos podem codificar uma ampla variedade de determinantes genéticos, permitindo que seu hospedeiro sobreviva melhor em ambientes adversos (BROCK *et al.* 1994, MATTÉ 1996).

O material genético contido nos plasmídios pode ser transferido de uma célula bacteriana para outra por diferentes processos: conjugação, transdução ou transformação. De acordo com a capacidade que os plasmídios tenham ou não de promover sua própria transferência de uma célula bacteriana para outra, podem ser denominados de conjugativos ou não conjugativos (BROCK *et al.* 1994, MATTÉ 1996, ALBERTS *et al.* 1999).

Os plasmídios são especialmente importantes na rápida transferência de material genético na comunidade microbiana. Esgotos hospitalares ou domésticos, corpos d'água doce e salgada, animais, plantas e solos, possuem bactérias capazes de transferir seus plasmídios por conjugação. Desse modo, genes que codificam a produção de resistência a determinados antibióticos ou ainda, caminhos para degradação, podem ser transferidos de uma variedade de espécies bacterianas em muitos gêneros, portanto genes que codificam a resistência a antibióticos são, rapidamente, disseminados entre as populações bacterianas (ATLAS *et al.* 1993, BROCK *et al.* 1994).

A grande importância dos plasmídios conjugativos no ambiente é que se um pequeno número de bactérias portadoras desses plasmídios for introduzido no ambiente com grande número de bactérias receptoras apropriadas, esse pode rapidamente converter toda população em doadora, o que pode gerar problemas no tratamento de doenças infecciosas (MATTÉ 1996).

Alguns plasmídios podem ser responsáveis pela produção de toxinas, outros podem conter genes que são responsáveis pela resistência da célula hospedeira a íons e metais pesados, ou ainda existem os que são responsáveis por atividades catabólicas (BROCK *et al.* 1994).

MORGAM *et al.* (1991), utilizaram a presença de plasmídios como método para a pesquisa de sobrevivência de *A. salmonicida* em água de lago, em um sistema de microcosmos, detectaram plasmídios nas células bacterianas vinte e um dias após o início do experimento.

MORENA *et al.* (1993), empregaram a análise do perfil plasmidial e eletroforese de campo pulsado (PFGE) para o estudo de cepas de *Aeromonas* no intuito de relacionar e caracterizar isolados de fezes de crianças com diarréia. Obtiveram um padrão de DNA idêntico para duas crianças envolvidas no surto; enquanto as cepas restantes apresentavam diferentes padrões.

SANDAA e ENGER (1994), pesquisaram a transferência de plasmídios naturais codificadores de múltipla resistência a antibióticos, em cepas de *A. salmonicida*. Em um sistema de microcosmos utilizaram este microrganismo como célula doadora de plasmídios de resistência, e observaram que a transferência desses plasmídios ocorria para a célula receptora (*Escherichia coli*) dentro do sistema, com alta freqüência mesmo na ausência de um fator seletivo, ou seja, em um meio que não continha antibiótico.

HANNINEN *et al.* (1995), caracterizaram genotipicamente cepas de *A. salmonicida* isoladas na Finlândia. Utilizaram a análise do perfil plasmidial e PCR e encontraram oito perfis entre as vinte e oito cepas estudadas. Observaram que essa espécie de *Aeromonas* geralmente apresenta um ou mais plasmídios grandes (com tamanho superior a 50 Kb), e também plasmídios pequenos de tamanhos universais (cerca de 200 pb).

MATTÉ (1996), não observou correlação entre a presença de plasmídios e a produção de fatores de virulência pelas cepas de *Aeromonas* estudadas da Represa do Guarapiranga – SP, porém relata que a expressão destes fatores de virulência, em específico da produção de β-hemolisina e acúmulo de fluído em alça ligada de coelho, tenham sua codificação determinada em termos genômicos, entretanto não descarta a possibilidade do papel destes plasmídios em resistência a antibióticos, sugerindo estudos mais aprofundados.

BROWN *et al.* (1997) analisando o perfil plasmidial em *Aeromonas* spp de amostras ambientais e clínicas, verificaram que os plasmídios eram mais comumente encontrados em cepas provenientes de amostras ambientais do que nas encontradas em amostras clínicas.

Atualmente existem poucos estudos sobre o perfil plasmidial de organismos do gênero *Aeromonas* sendo relevante salientar que a análise do perfil plasmidial é importante uma vez que os plasmídios podem estar associados à rápida transferência de material genético na comunidade microbiana, podem conferir resistência à antibióticos e à metais pesados, ou ainda serem responsáveis pela produção de uma série de fatores de virulência (ATLAS e BARTHA 1993, BROCK *et al.* 1994).

2. OBJETIVOS

Tomando-se como base o pouco conhecimento existente sobre a biodiversidade de *Aeromonas* spp, principalmente nas coleções hídricas existentes em São Paulo, seus fatores de virulência e conseqüente risco para a população; e os escassos estudos de natureza molecular com microrganismos deste gênero no Brasil, o presente estudo foi realizado com os seguintes objetivos:

2.1. Objetivo Geral:

- Estudar a diversidade e caracterizar o perfil plasmidial, das diferentes espécies do gênero *Aeromonas* provenientes de corpos de água doce, salobra e salgada, em diferentes regiões do Estado de São Paulo.

2.2. Objetivos específicos:

- Discutir a eficiência dos meios de cultura, ágar sangue ampicilina, ágar amido ampicilina e ágar MacConkey, utilizados na recuperação de diferentes espécies de *Aeromonas*.

- Atualizar a classificação das espécies isoladas nos meios de cultura propostos, de acordo com a nova tabela de características fenotípicas.

- Fazer o levantamento dos dados da qualidade da água dos pontos de amostragem na época das coletas, nos órgãos responsáveis.

- Pesquisar a presença de plasmídios nas cepas de *Aeromonas* isoladas dos diferentes ambientes aquáticos.

- Analisar o perfil plasmidial encontrado nas espécies isoladas e discutir sua relevância para a Saúde Pública.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi dividido em duas etapas, a primeira consistiu na coleta e processamento das amostras que foi realizada durante o projeto de Iniciação Científica, no ano de 2000. A segunda etapa teve inicio em 2003 e consistiu na reclassificação das espécies isoladas e na caracterização molecular, através da extração de DNA plasmidial. Ambas as etapas foram realizadas no Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

3.1. Caracterização da Área de Estudo

Os pontos de coleta foram determinados de acordo com sua importância para a população local, sendo escolhidos os pontos utilizados para a captação de água para consumo humano, atividade de pesca ou recreação. Foram coletadas também, amostras de água de rios com alto gradiente de poluição, para a determinação da ocorrência de *Aeromonas* spp nesse tipo de ambiente.

O **Quadro 1** a seguir, apresenta os pontos coletados no presente estudo.

3.1.1. Região Metropolitana de São Paulo

Devido ao alto gradiente de poluição, foram coletadas amostras na Bacia do Rio Tietê Alto, Zona Metropolitana. A coleta foi feita nos rios: Pinheiros – **Amostra 1** (altura da ponte Jaguaré) e Tietê – **Amostra 2** (altura da ponte Casa Verde).

Quadro 1: Pontos de coleta, local de amostragem e tipo de amostra, coletados no presente estudo, São Paulo, 2000.

Ponto	Local da Amostragem	Tipo de Amostra
1	Rio Pinheiros - SP	água doce
2	Rio Tietê - SP	água doce
3	Rio Tietê - Salto	água doce
4	Represa Billings - Prainha ETE	água doce
5	Represa Billings - Prainha Parque Municipal	água doce
6	Rio Ribeira do Iguape - Iporanga	água doce
7	Rio Betari - Iporanga	água doce
8	Rio Iporanga - ponto1 - Iporanga	água doce
9	Rio Iporanga - ponto2 - Iporanga	água doce
10	Caverna Água Suja - Iporanga	água doce
11	Caverna Santana - Iporanga	água doce
12	Praia Iperoig - Ubatuba	água salgada
13	Praia Grande - Ubatuba	água salgada
14	Balneário Flórida - Praia Grande	água salgada
15	Centro - Mongaguá	água salgada
16	Balneário Gaivota - Itanhaém	água salgada
17	Praia José Menino - Santos	água salgada
18	Praia Itararé - São Vicente	água salgada
19	Mangue do Casqueiro - Cubatão	água salobra

O Rio Tietê, desde a sua entrada na cidade de São Paulo, na divisa com o município de Itaquaquecetuba, até a barragem de Pirapora, numa extensão de 86 km, tem como principais constituintes os rios Baquirivu-Guaçu, Guarapira, Tamanduateí, Pinheiros e Juqueri e os córregos Aricanduva e Cabuçu de Baixo. Sua água é destinada ao abastecimento público e industrial, e ao afastamento de efluentes domésticos e industriais. A poluição nestes pontos de coleta é abundante. O Sistema Operacional do Tietê Alto permite reverter as águas barradas e conduzí-las através de estações elevatórias, ao Reservatório Billings (CETESB, 2000a).

Figura 1: Rio Pinheiros (a esquerda) e Rio Tietê (a direita), pontos coletados (amostras 1 e 2, respectivamente), na região metropolitana de São Paulo, 2000.

3.1.2. Salto

A Bacia do Rio Tietê Médio-Superior tem extensão de aproximadamente 270 Km desde a saída do Reservatório de Pirapora até a barragem de Barra Bonita. A água deste rio destina-se ao abastecimento público, afastamento de efluentes domésticos, abastecimento industrial e lançamentos em suas águas de efluentes industriais (CETESB, 2000a). A coleta deste ponto **(Amostra 3)** foi feita no município de Salto, distante aproximadamente 100 Km do centro de São Paulo.

3.1.3. São Bernardo do Campo

O Reservatório Billings, idealizado para a geração de energia elétrica, tem sido utilizado para outras finalidades como o lazer e a pesca, bem como para o abastecimento público. Apresenta uma área de 120 Km^2, um volume estimado em $1{,}20 \times 10^9$ m^3 e está localizado no município de São Bernardo do Campo. O Reservatório Billings recebe as águas do rio Tietê e rio Pinheiros, através dos bombeamentos na Estação Elevatória de Pedreira.

A água deste reservatório destina-se ao abastecimento público (integra o sistema de abastecimento da Região Metropolitana de São Paulo) e industrial, afastamento de efluentes domésticos, inclusive as contribuições eventuais daqueles gerados na Grande São Paulo, através do bombeamento das águas do Rio Pinheiros e lançamentos de efluentes líquidos industriais (CETESB, 2000a).

A coleta neste reservatório foi feita em dois pontos: na Prainha em frente a Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) – **Amostra 4** (próximo a rodovia Anchieta, junto à captação da SABESP) e na Prainha do Parque Municipal – **Amostra 5**.

Figura 2: Pontos de coleta do Reservatório Billings (em vermelho), São Bernardo do Campo, 2000.

3.1.4. Vale do Ribeira

Esta região tem como principais constituintes os rios Juquiá, Ribeira e Ribeira do Iguape, além dos rios que deságuam no mar, desde o município de Iguape até a divisa com o Estado do Paraná. A água destes rios destina-se ao abastecimento público, afastamento de efluentes domésticos e irrigação de plantações (banana, chá e arroz). Nesta região,

encontram-se a Área de Proteção Ambiental da Serra do Mar, o Parque Estadual Turístico do Alto do Ribeira – PETAR entre outras áreas de Proteção Ambiental.

No município de Iporanga, foi feita a coleta nos rios Ribeira do Iguape – **Amostra 6**, Betari – **Amostra 7** e Iporanga dividido em dois pontos um antes – **Amostra 8** e outro depois do posto da SABESP – **Amostra 9**. Os rios Betari e Iporanga são afluentes do Rio Ribeira do Iguape.

Além desses rios, foram coletadas amostras das cavernas Água Suja – **Amostra 10** e Santana – **Amostra 11**, localizadas no Núcleo Santana situadas no Parque Estadual Turístico do Alto do Ribeira – PETAR. O rio Betari atravessa essas duas cavernas.

A caverna Santana é a mais visitada da região, seus visitantes não entram em contato com a água, porém é habitada por morcegos, o que implicaria num aumento de matéria orgânica presente na água. A caverna Água Suja, apesar de seu nome, possui águas cristalinas e não é habitada por morcegos, porém seus visitantes ficam em constante contato com a água. A **Figura 3** a seguir representa a cidade de Iporanga e os rios onde as coletas foram realizadas.

3.1.5. Litoral Norte e Sul

No Litoral Norte, foram coletadas águas das praias Iperoig – **Amostra 12** e Praia Grande – **Amostra 13**, localizadas no município de Ubatuba.

No Litoral Sul, foram coletadas águas das praias dos seguintes municípios: Praia Grande (Balneário Flórida – **Amostra 14**), Mongaguá (Centro – **Amostra 15**), Itanhaém (Balneário Gaivota – **Amostra 16**), Santos (Praia José Menino – **Amotra 17**) e São Vicente (Praia Itararé – **Amostra 18**).Ainda no Litoral Sul foi coletada água no mangue do Casqueiro – **Amostra 19**, localizado no município de Cubatão, sendo este o ponto de coleta de água salobra.

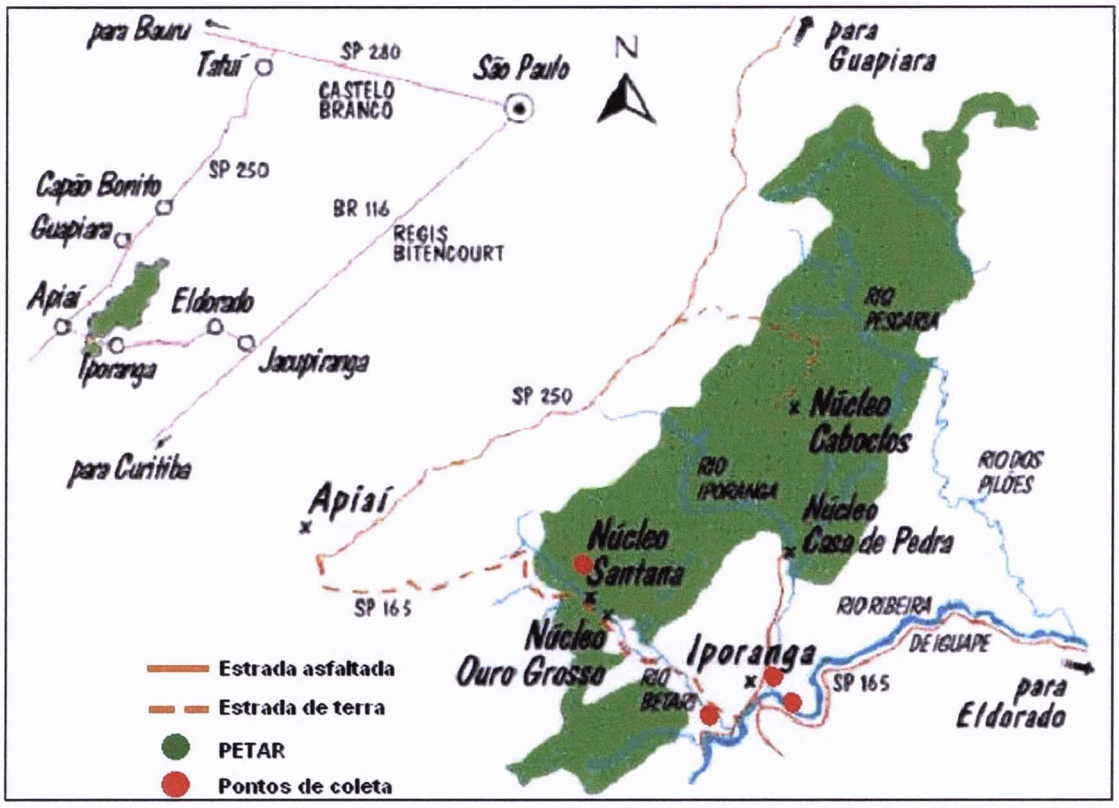

Figura 3: Pontos de coleta no Vale do Ribeira. Cavernas Água Suja e Santana localizadas no Núcleo Santana e Rios Iporanga, Ribeira de Iguape e Betari, Vale do Ribeira – SP, 2000.

3.2. Índice de Qualidade da Água (IQA) e Balneabilidade dos Ambientes Estudados

Os pontos de amostragem estudados foram pré-selecionados com base nas características visíveis de impacto ambiental. Para a confirmação das características de cada ambiente, foi realizado o levantamento dos dados da CETESB do ano de coleta das amostras (2000).

Para a determinação do Índice de Qualidade da Água – IQA dos ambientes estudados, foi realizado o levantamento nas entidades

responsáveis (CETESB). Os valores selecionados correspondem ao ponto coletado mais próximo, utilizados no presente estudo.

3.2.1. Índice de Qualidade da Água – IQA

O Índice de Qualidades das Águas – IQA incorpora 9 parâmetros (coliformes fecais, pH, DBO, nitrogênio total, fósforo total, temperatura, turbidez, resíduo total e oxigênio dissolvido), que são considerados relevantes para a avaliação da qualidade das águas, tendo como determinante principal a utilização das mesmas para o abastecimento público (CETESB, 2000a). A classificação do IQA é determinado segundo a seguinte gradação:

- Qualidade Ótima $79 < IQA \leq 100$
- Qualidade Boa $51 < IQA \leq 79$
- Qualidade Regular $36 < IQA \leq 51$
- Qualidade Ruim $19 < IQA \leq 36$
- Qualidade Péssima $IQA < 19$

3.2.2. Balneabilidade das Águas do Mar

Balneabilidade é a qualidade das águas destinadas à recreação de contato primário, sendo este entendido como um contato direto e prolongado com a água (natação, mergulho, esqui-aquático, etc), onde a possibilidade de ingerir quantidades apreciáveis de água é elevada.

Segundo a CETESB, o parâmetro indicador básico para a classificação das praias quanto a sua balneabilidade em termos sanitários é a densidade de coliformes fecais. Diversos são os fatores que condicionam a presença de esgotos nas praias:

- Existência de sistemas de coleta e disposição dos despejos domésticos gerados nas proximidades;

- Existência de córregos afluindo ao mar;
- Afluência turística durante os períodos de temporada;
- Fisiografia da praia;
- Ocorrência de chuvas, e
- Condições da maré.

O **Quadro 2** apresenta os dados da qualidade da água de cada ponto de amostragem estudados.

Quadro 2: Dados da qualidade da água de cada ponto de amostragem estudados, segundo CETESB, São Paulo, 2000.

AMOSTRA		QUALIDADE
1	Pinheiros	
2	Tietê - SP	
3	Tietê - Salto	
4	Prainha ETE	
5	Prainha Parque Municipal	
6	Ribeira do Iguape	
7	Betari	**ND**
8	Iporanga - ponto1	**ND**
9	Iporanga - ponto2	**ND**
10	Água Suja	**ND**
11	Santana	**ND**
12	Iperoig	
13	Praia Grande	
14	Balneário Flórida	
15	Centro	
16	Balneário Gaivota	
17	Praia José Menino	
18	Praia Itararé	
19	Mangue do Casqueiro	

Onde:

Ótima	**Boa**	**Aceitável**	**Ruim**	**Péssima**

ND: Não Determinado

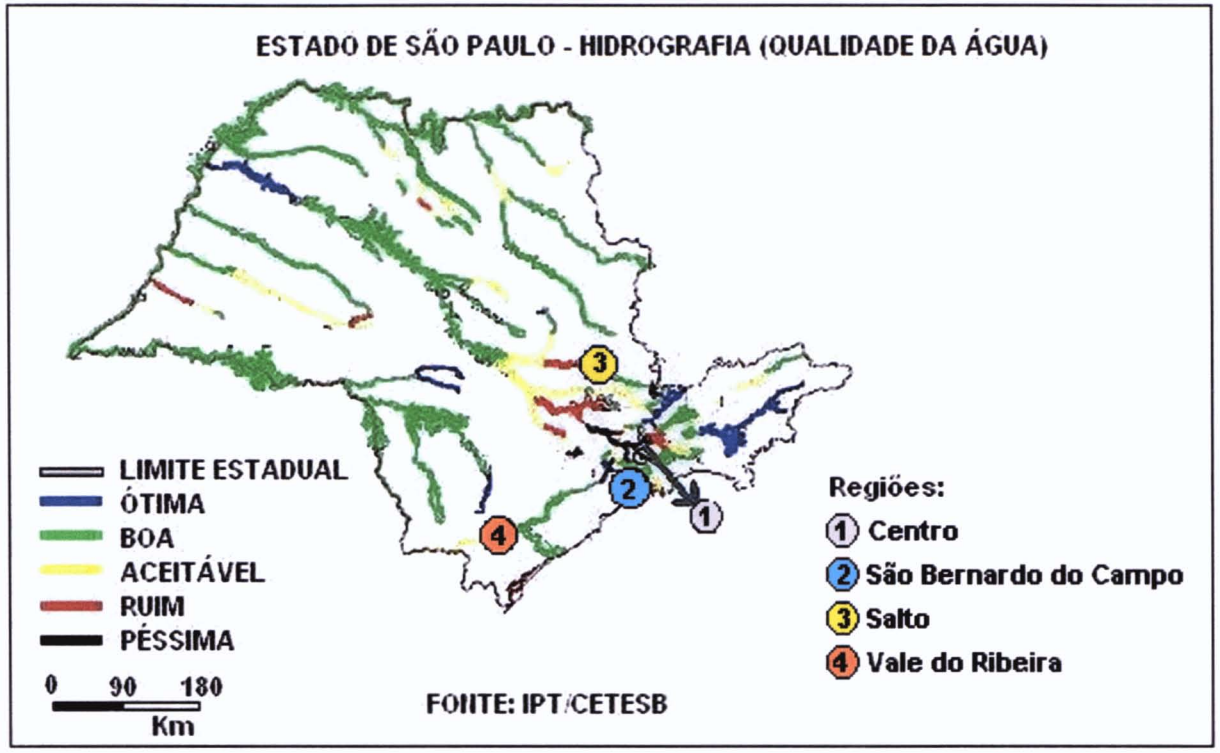

Figura 4: Localização das diferentes regiões de coleta dos pontos de água doce na figura obtida no site http://www.uniagua.org.br/default.asp?tp=3&pag=qualidade.htm, preparado com base nos dados da CETESB para o ano de 2000.

3.3. Coleta das Amostras

As coletas foram realizadas no período de dezembro de 1999 a julho de 2000, totalizando 19 amostras sendo 11 de água doce, 1 salobra e 7 salgada.

Volumes de 1 litro de água doce e salobra, e 500 mL de água salgada foram coletadas em frascos de vidros previamente esterilizados. A temperatura da água foi medida no ato da coleta com termômetro de mercúrio e as amostras foram transportadas para o laboratório em geladeiras de isopor para a manutenção da temperatura. No laboratório, foi medido o pH das amostras com o medidor eletrônico de pH, e logo em seguida foi feito a filtração e o enriquecimento das mesmas a partir das membranas filtrantes. A metodologia está descrita no próximo item.

3.4. Processamento das Amostras

O processamento das amostras está resumido na **Figura 5**.

3.4.1. Concentração e Enriquecimento das Amostras

As amostras foram filtradas à vácuo, através de membrana filtrante (Millipore 0,45μm de porosidade). A membrana foi colocada em água peptonada alcalina (APA) (Anexo A.1.1), contendo 1% de cloreto de sódio e pH 8,4, sendo este incubado por 24 horas a 35°C. Após o período de incubação, foi semeada uma alçada do material de superfície do crescimento bacteriano em 5 placas de Petri contendo os diferentes meios de cultivo para o isolamento das colônias.

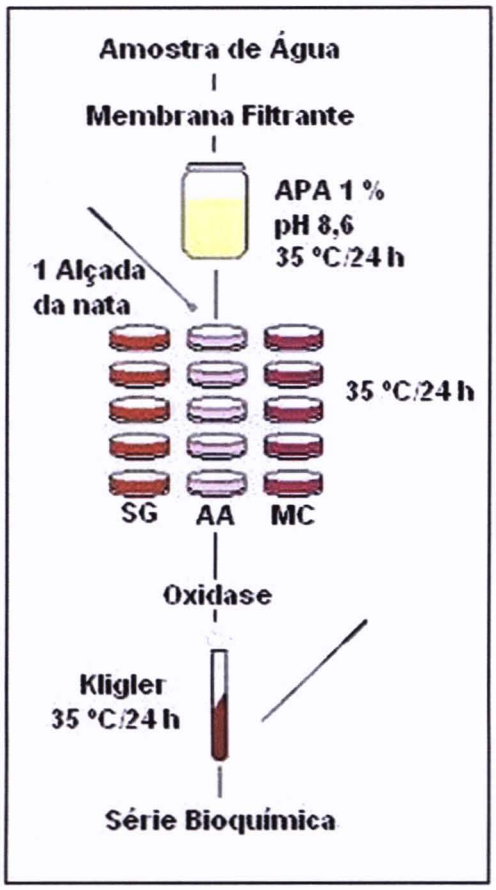

Figura 5: Resumo das etapas realizadas para o processamento das amostras de água, São Paulo, 2000.

3.4.2. Meios de Cultivo

Foram empregados para o isolamento das colônias de *Aeromonas* spp os meios: ágar sangue ampicilina (Anexo A.1.4) contendo 5% de eritrócitos de coelho e 10 μg/mL de ampicilina (MATTÉ 1995), ágar amido ampicilina (Anexo A.1.2) contendo 10 μg/mL de ampicilina (PALUMBO *et al.* 1985) e ágar MacConkey (Difco - Anexo A.1.3) (FALCÃO *et al.* 1998). Os meios foram incubados por 24 horas a 35°C.

3.4.3. Isolamento e Identificação das Colônias

As colônias que apresentaram características típicas do gênero *Aeromonas* para cada um dos meios propostos, ou seja:

- ✓ colônias não inibidas, de borda bem definida, lisas e brilhantes, com dois a três milímetros de diâmetro;
- ✓ transparentes no ágar MacConkey, brancas com halo transparente no ágar amido ampicilina e róseas ou acinzentadas no ágar sangue ampicilina, podendo neste estar com ou sem halo de hemólise;
- ✓ teste positivo para a produção da enzima citocromo oxidase (teste de oxidase - Anexo A.1.7).

As colônias foram selecionadas e triadas em meio ágar ferro de Kligler (Difco - Anexo A.1.5), para a determinação da produção de indol (Anexo A.1.9), acidificação da lactose, fermentação da glicose e produção de gás.

Para a identificação das espécies, foram utilizadas provas bioquímicas gerais e específicas para cada uma das colônias típicas, a saber: acidificação dos carboidratos (sacarose, manose, manitol, arabinose e salicina), crescimento em concentrações de 6,8,10% de cloreto de sódio e na ausência deste sal; hidrólise da esculina; lisina e ornitina descarboxilase e arginina dehidrolase (Anexo A.2).

A **Tabela 1** apresenta as características bioquímicas esperadas para as diferentes espécies de *Aeromonas*.

Tabela 1: Características bioquímicas esperadas para as diferentes espécies de *Aeromonas*.

Espécie	Arginina	Lisina	Ornitina	Sacarose	Esculina	Manitol	Salicina	Arabinose	Gás	Indol	Ampicilina	Beta hemolítica	VP
A. simiae	+	+	-	+	V	-	-	-	-	-	+	-	ND
A. hydrophila	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. bestiarum	+	+	-	+	+	+	V +	+	V +	+	+	+	V+
A. caviae	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V+	-
A. media	+	-	-	+	+	+	V -	+	-	+	V+	V-	-
A. eucrenophila	+	-	-	V +	+	+	+	V +	+	+	+	+	-
A. veronii sobria	+	+	-	+	-	+	-	V -	+	+	+	+	+
A. culicicola	+	+	-	+	ND	+	-	-	+	+	+	+	ND
A. veronii veronii	-	+	+	+	+	+	+	-	V +	+	+	+	V+
A. jandaei	+	+	-	V +	-	+	-	-	+	+	+	+	+
A. encheleia	+	-	-	V +	+	+	+	-	V +	+	+	V+	-
A. schubertii	+	V +	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V+	-
A. trota	+	+	-	V -	-	V +	-	-	V +	+	-	V	-
A. allosaccharophila	V +	+	V -	+	V +	+	-	V +	+	+	+	V-	-
A. popoffii	+	-	-	-	-	+	-	V	+	V +	+	-	+
A. salmonicida	V-	V-	-	+	+	+	V-	+	V+	+	+	V-	V-
A. molluscorum	ND	ND	ND	+	+	+	V+	+	-	-	+	ND	-

Fonte: Pidiyar *et al.* 2002, Abbott *et al.* 2003, Harf-Monteil *et al.* 2004, Miñana-Galbis *et al.* 2004 .

+ = >85% cepas positivas; **-** = >85% cepas negativas; **V**= 50%; **V+** =50 a 85% cepas positivas; **V-** = 15 a 85% cepas negativas; **ND** = Não determinado.

3.5. Caracterização Molecular das cepas de *Aeromonas*

As cepas de *Aeromonas* spp que foram caracterizadas molecularmente são provenientes de amostras de água doce, salobra e salgada, as quais foram coletadas durante o projeto de Iniciação Científica, realizado no Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública – USP, no ano de 2000.

Neste estudo, foram utilizadas 273 cepas de *Aeromonas* spp provenientes das amostras coletadas em 2000, cujas espécies foram reclassificadas quanto às suas características fenotípicas, segundo a **Tabela 1** (página 41).

3.5.1. Armazenamento das cepas de *Aeromonas*

Para a estocagem das cepas, todas foram semeadas em caldo lúria (Anexo A.1.6) e incubadas a 35°C por 24 horas. Após esse período, 0,5 mL da suspensão com o crescimento bacteriano foi transferido para um microtubo tipo "eppendorf" contendo 0,5 mL de glicerol 80% (Anexo A.1.8) estéril para a conservação em freezer -70°C.

3.5.2. Extração de DNA plasmidial

As cepas do gênero *Aeromonas* isoladas na primeira etapa tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos pelo método descrito por BIRNBORN e DOLY (1979).

As cepas foram semeadas em 3 mL de caldo lúria e cultivadas por 18 horas a 35°C, após esse período foram semeadas em 6 mL de caldo lúria e novamente incubadas por 18 horas a 35°C. As culturas foram então centrifugadas por 15 minutos a 5.000 rpm e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de solução salina 0,85% (Anexo A.1.10) estéril e essa solução contendo o crescimento bacteriano foi transferida para um microtubo tipo "eppendorf".

Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm e ao sedimento foi adicionado 100 μL de solução I (Anexo A.3.1). Depois foram incubados em banho de gelo por 30 minutos.

Foram adicionados em cada tubo, 200 μL de solução II (Anexo A.3.2) seguida de incubação em banho de gelo por 5 minutos. Foram adicionados 150 μL de solução III (Anexo A.3.3), e homogeneizados por inversão de 12 a 15 vezes, até ser observada a formação de um precipitado branco floculento. Os tubos foram incubados em freezer -20°C por uma hora e trinta minutos.

Os tubos foram centrifugados a 4°C por 25 minutos à velocidade de 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos (aproximadamente 400 μL) e foram adicionados de 1 mL de etanol P.A. gelado (-20°C), sendo incubados por no mínimo 1 hora a -20°C. Após esse período, foram centrifugados por 25 minutos a 10.000 rpm a 4°C.

Os sobrenadantes foram descartados cuidadosamente por inversão dos tubos, e os precipitados foram ressuspensos em 100 μL de solução IV (Anexo A.3.4), sendo adicionados 250 μL de etanol P.A. gelado (-20°C).

Os tubos foram homogeneizados por inversão, e incubados por 18 horas a -20°C. Após esse período, foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C.

Os sobrenadantes foram descartados e ao precipitado, adicionado 1 mL de etanol 70% gelado. Os tubos foram centrifugados novamente por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C, e os sobrenadantes descartados.

Os sedimentos foram secos a vácuo e após 24 horas, estes foram dissolvidos em 15 μL de tampão TE II (Anexo A.3.5).

Para a visualização das bandas de plasmídio, o material obtido foi corado com tampão corante 6X (Anexo A.4.4) e submetido à eletroforese em

gel de agarose 1,2% (Anexo A.4.1) com intensidade de 80 V por 4 horas. Ao final, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio (Anexo A.4.2) e submetido a uma fonte de luz ultravioleta para a detecção de bandas de plasmídio. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e software Labworks (UVP). A medida dos fragmentos foi determinada pelo software Gelworks 1D Advanced 4.01(UVP).

4. RESULTADOS

Este estudo teve um total de 19 amostras de água analisadas, das quais foram isoladas 273 cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas*. Os resultados da análise físico-química da água, assim como a data da coleta, estão apresentados no **Quadro 3**, onde observa-se que a temperatura média foi de 24 °C e o pH variou de 6,2 a 8,5.

A **Tabela 2** apresenta a quantidade de espécies isoladas no total, sendo que das 273 cepas, 159 (58,3%) foram identificadas quanto à espécie e 114 (41,7%) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Aeromonas*, sem definição da espécie, uma vez que as características dessas cepas eram atípicas às espécies deste gênero.

O Índice de Qualidade de Água – IQA e a Balneabilidade, foram determinados de acordo com levantamento feito nas entidades responsáveis (CETESB), onde observou-se que das 19 amostras analisadas, 4 (21,1%) estavam em ótimas condições, 2 (10,5%) estavam em boas condições, 5 (26,3%) em condições aceitáveis, 1 (5,3%) em condição ruim, 2 (10,5%) em péssimas condições e 5 (26,3%) não tiveram seu IQA determinado pela CETESB, por não se tratarem de pontos analisados por esta companhia.

A extração do DNA plasmidial foi realizada no período de julho de 2003 a março de 2004 e verificou-se que das 273 cepas pesquisadas, 118 (43,2 %) apresentaram pelo menos 1 plasmídio de baixo peso molecular (abaixo de 23 kb) e 84 (30,8%) apresentaram pelo menos 1 plasmídio de alto peso molecular (acima de 23 kb). Foi observado até 9 plasmídios em uma mesma cepa.

Quadro 3: Localização e parâmetros físico-químicos e amostras de água de São Paulo, coletados no período de dezembro de 1999 a julho de 2000, São Paulo.

AMOSTRAS			Data da coleta	Temp. °C	pH
Região	Tipo de Amostra	Local			
Região Metropolitana de SP	Água doce	Rio Pinheiros – SP	28/6/2000	23,5	7,2
		Rio Tietê – SP	28/6/2000	22	7,3
Salto	Água doce	Rio Tietê – Salto	4/6/2000	21	7,1
São Bernardo do Campo	Água doce	Represa Billings - Prainha ETE	21/5/2000	21	6,2
		Represa Billings - Prainha Parque Municipal	21/5/2000	21	6,5
Vale do Ribeira	Água doce	Rio Ribeira do Iguape	13/1/2000	29	7
		Rio Betari	1/1/2000	20	8,3
		Rio Iporanga - ponto1	29/12/1999	27	8
		Rio Iporanga - ponto2	13/1/2000	27	7,6
	Água doce	Caverna Água Suja	29/4/2000	19	8,5
		Caverna Santana	29/4/2000	20	8,2
Litoral Norte	Água salgada	Praia Iperoig – Ubatuba	23/4/2000	26,5	8,3
		Praia Grande – Ubatuba	23/4/2000	26	8,5
Litoral Sul	Água salgada	Balneário Flórida – Praia Grande	16/4/2000	27,6	7,9
	Água salgada	Centro – Mongaguá	16/4/2000	27,5	7,8
	Água salgada	Balneário Gaivota – Itanhaém	16/4/2000	28	8
	Água salgada	Praia José Menino – Santos	3/7/2000	22	7,9
	Água salgada	Praia Itararé – São Vicente	3/7/2000	22	7,9
	Água salobra	Mangue do Casqueiro – Cubatão	11/6/2000	24	7,5

Tabela 2: Número e porcentagem de espécies do gênero *Aeromonas* isoladas de todas as amostras de água analisadas, São Paulo, 2000.

Espécie	Total	
	N	%
A. eucrenophila	42	15,4
A. encheleia	25	9,2
A. hydrophila	22	8,1
A. allosaccharophila	13	4,8
A. bestiarum	11	4,0
A. popoffii	10	3,7
A. caviae	9	3,3
A. salmonicida	8	2,9
A. veronii veronii	7	2,6
A. trota	5	1,8
A. schubertii	5	1,8
A. jandaeii	1	0,4
A. veronii sobria	1	0,4
Aeromonas spp	114	41,8
TOTAL	273	100,0

4.1. Ocorrência de *Aeromonas* nos Ambientes Estudados

4.1.1. Isolamento de *Aeromonas* de acordo com as amostras

Das 19 amostras analisadas, observou-se que o ponto que apresentou maior número de organismos isolados foi no rio Tietê localizado no município de Salto, seguido pelos pontos 1 e 2 do rio Iporanga, e pela caverna Santana, incluindo os isolados que não tiveram a definição da espécie.

O rio Pinheiros (localizado em SP), a Praia Grande (Ubatuba) e o Balneário Gaivota (Itanhaém), não apresentaram nenhuma cepa pertencente ao grupo das *Aeromonas*. A **Tabela 3** e a **Figura 6** apresentam a quantidade de cepas isoladas em cada ponto estudado.

Levando-se em consideração as regiões estudadas: Região Metropolitana de SP, Salto, São Bernardo do Campo, Vale do Ribeira, Litoral Norte e Litoral Sul, pôde-se observar que a região que apresentou maior número de isolados de *Aeromonas* foi a região do Vale do Ribeira, onde

foram isoladas 168 cepas de Aeromonas, seguida pelas regiões de Salto, com 61 cepas, Litoral Sul, com 28, São Bernardo do Campo, com 14 e Centro e Litoral Norte, com 1 cepa isolada de cada região. A **Figura 7** a seguir demonstra o percentual de cepas de *Aeromonas* isoladas por região estudada.

Tabela 3: Número e porcentagem de cepas de *Aeromonas* isoladas dos ambientes aquáticos estudados do Estado de São Paulo, 2000.

AMOSTRAS				Cepas	
Região	Tipo	No.	Pontos de Amostragem	N	%
Região Metropolitana de SP	Água doce	1	Rio Pinheiros – SP	0	0,0
		2	Rio Tietê – SP	1	0,4
Salto	Água doce	3	Rio Tietê – Salto	61	22,3
São Bernardo do Campo	Água doce	4	Rep. Billings - Prainha ETE	3	1,1
		5	Rep. Billings - Prainha Parque Municipal	11	4,0
Vale do Ribeira	Água doce	6	Rio Ribeira do Iguape	23	8,4
		7	Rio Betari	2	0,7
		8	Rio Iporanga - ponto1	54	19,8
		9	Rio Iporanga - ponto2	44	16,1
	Água doce	10	Caverna Água Suja	4	1,5
		11	Caverna Santana	41	15,0
Litoral Norte	Água salgada	12	Praia Iperoig – Ubatuba	1	0,4
		13	Praia Grande – Ubatuba	0	0,0
Litoral Sul	Água salgada	14	Balneário Flórida – P. Grande	1	0,4
	Água salgada	15	Centro – Mongaguá	4	1,5
	Água salgada	16	Balneário Gaivota – Itanhaém	0	0,0
	Água salgada	17	Praia José Menino – Santos	10	3,7
	Água salgada	18	Praia Itararé – São Vicente	3	1,1
	Água salobra	19	Mangue do Casqueiro – Cubatão	10	3,7
TOTAL				273	100,0

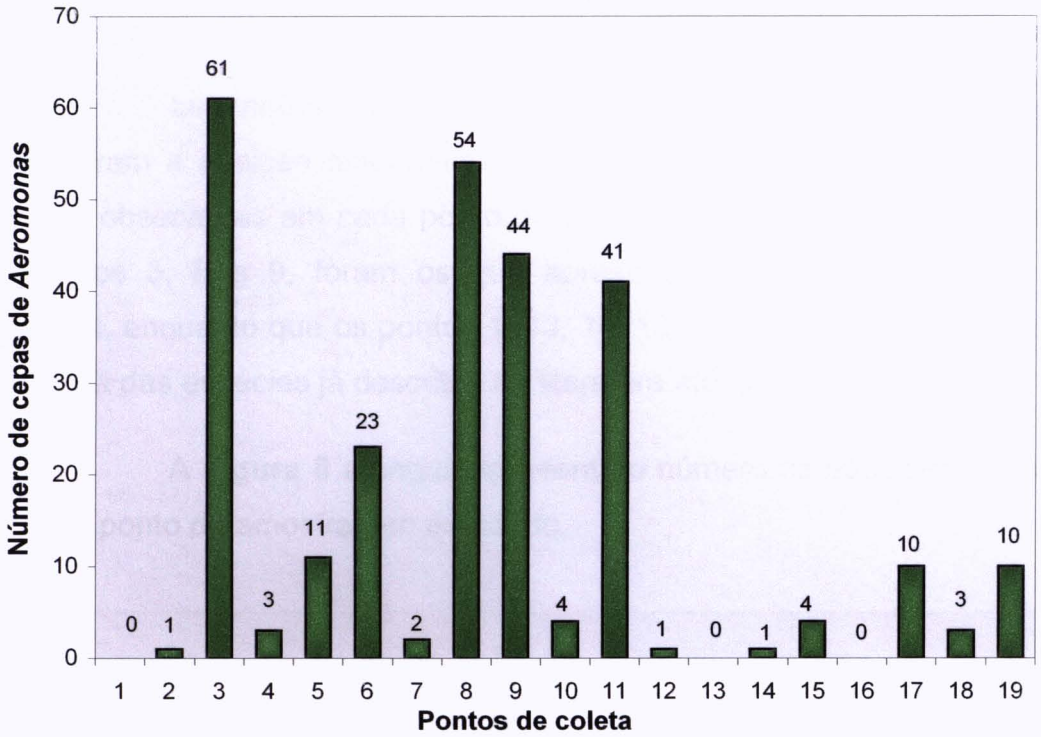

Figura 6: Número de cepas de *Aeromonas* isoladas dos ambientes aquáticos estudados do Estado de São Paulo, 2000.

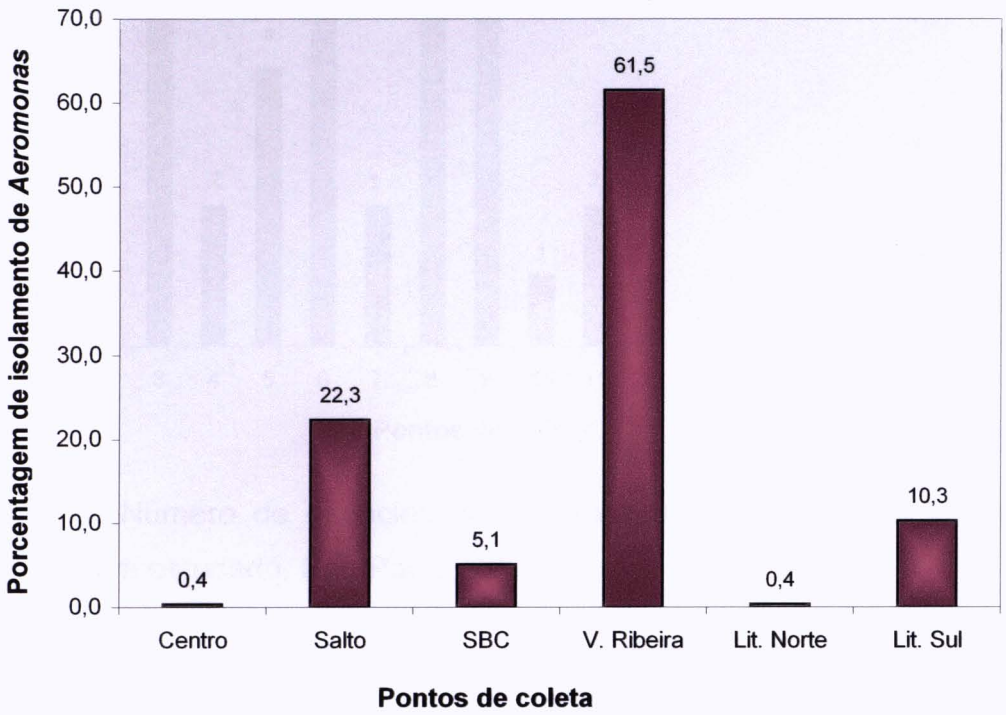

Figura 7: Porcentagem de isolamento de cepas de *Aeromonas* isoladas dos ambientes aquáticos estudados do Estado de São Paulo, 2000.

4.1.2. Espécies de *Aeromonas* isoladas de cada amostra estudada

Levando-se em consideração apenas a quantidade de cepas que tiveram a posição taxonômica definida em relação à classificação de espécie observadas em cada ponto de amostragem, pôde-se observar que os pontos 3, 8 e 9, foram os que apresentaram maior diversidade de espécies, enquanto que os pontos 1, 13, 14, 15, 16 e 18, não apresentaram nenhuma das espécies já descritas na literatura até julho de 2004.

A **Figura 8** a seguir apresenta o número de espécies isoladas de cada ponto de amostragem estudado.

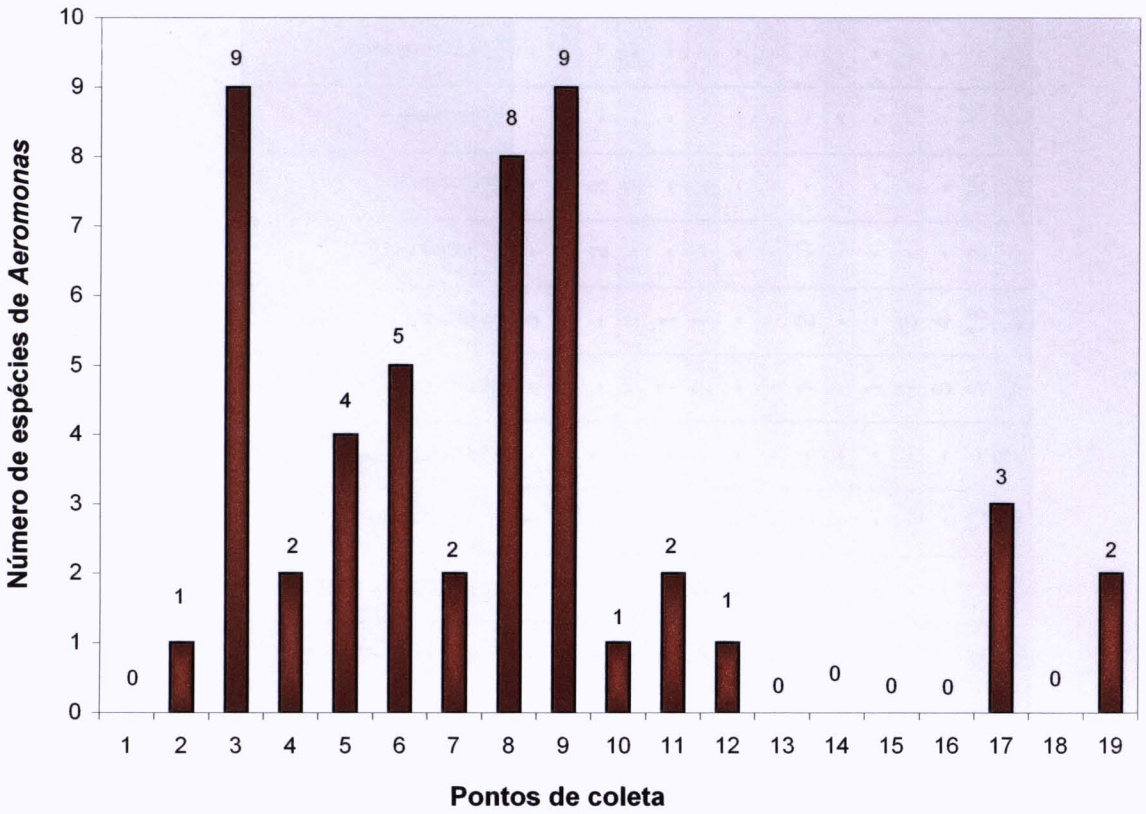

Figura 8: Número de espécies de *Aeromonas* observadas por ponto de amostragem estudado, São Paulo, 2004.

A **Tabela 4** apresenta as espécies isoladas por ponto de amostragem.

Tabela 4: Freqüência de isolamento das diferentes espécies de *Aeromonas* em amostras de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, 2004.

Espécies	Pinheiros	Tietê - SP	Tietê - Salto	Prainha ETE	Prainha P. Municipal	Ribeira do Iguape	Betari	Iporanga - ponto1	Iporanga - ponto2	Água Suja	Santana	Iperóig	Praia Grande	Balneário Flórida	Centro	Balneário Gaivota	Praia José Menino	Praia Itararé	Mangue Caçapava	TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
A. hydrophila	-	-	15	-	1	1	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**22**
A. encheleia	-	-	4	-	-	5	-	6	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	**25**
A. allosaccharophila	-	-	5	1	1	-	1	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	**13**
A. eucrenophila	-	-	2	-	-	-	1	33	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	4	**42**
A. veronii veronii	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	**7**
A. bestiarum	-	-	6	-	2	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**11**
A. caviae	-	-	3	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**9**
A. schubertii	-	-	3	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	**5**
A. salmonicida	-	-	3	-	-	2	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**8**
A. veronii sobria	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**1**
A. jandaeii	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**1**
A. trota	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	**5**
A. popoffii	-	-	-	-	-	-	-	6	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**10**
Aeromonas spp	-	1	19	1	2	13	-	3	18	2	36	1	-	1	4	-	5	3	5	**114**
TOTAL	**0**	**1**	**61**	**3**	**11**	**23**	**2**	**54**	**44**	**4**	**41**	**1**	**0**	**1**	**4**	**0**	**10**	**3**	**10**	**273**

4.1.3. Isolamento de *Aeromonas* de acordo com os meios de cultura empregados

Das 273 cepas de *Aeromonas* isoladas, 100 (36,6%) foram provenientes do ágar MacConkey (MC), 100 (36,6%) do ágar Amido Ampicilina (AA) e 73 (26,2%), do ágar Sangue Ampicilina (SG). A **Figura 9** apresenta o percentual de *Aeromonas* identificadas e não identificadas isoladas em cada meio de cultura utilizado.

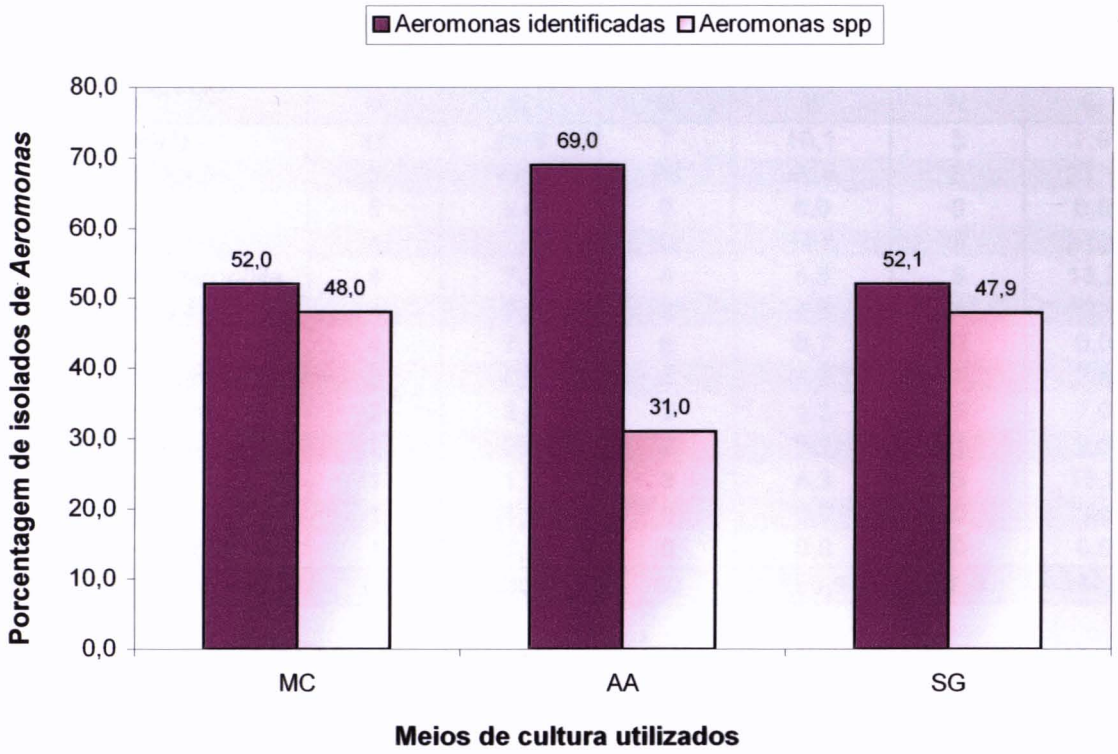

Figura 9: Porcentagem de cepas de *Aeromonas* isoladas nos meios de cultura utilizados, considerando as espécies identificadas e as que não tiveram uma posição taxonômica definida quanto à espécie, São Paulo, 2004.

Levando-se em consideração, apenas as 159 (58,3%) cepas identificadas quanto à espécie, pôde-se observar que para cada meio de cultura utilizado, houve uma preferência das espécies, que cresceram em maior ou menor quantidade, dependendo do meio empregado, como demonstrado na **Tabela 5** e **Figura 10** a seguir.

Tabela 5: Número e porcentagem das diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, segundo os diferentes meios de cultura empregados, 2004.

Espécie	MC		AA		SG	
	N	%	N	%	N	%
A. encheleia	15	28,8	7	10,1	3	7,9
A. eucrenophila	6	11,5	28	40,6	8	21,1
A. trota	5	9,6	0	0,0	0	0,0
A. hydrophila	4	7,7	10	14,5	8	21,1
A. allosaccharophila	4	7,7	4	5,8	5	13,2
A. bestiarum	4	7,7	3	4,3	4	10,5
A. popoffii	4	7,7	6	8,7	0	0,0
A. veronii veronii	3	5,8	3	4,3	1	2,6
A. salmonicida	2	3,8	3	4,3	3	7,9
A. schubertii	2	3,8	2	2,9	1	2,6
A. caviae	1	1,9	3	4,3	5	13,2
A. jandaeii	1	1,9	0	0,0	0	0,0
A. veronii sobria	1	1,9	0	0,0	0	0,0
TOTAL	52	100,0	69	100,0	38,0	100,0

Onde:

MC = Ágar MacConkey; AA = ágar Amido Ampicilina e SG = Ágar Sangue Ampicilina

Quando se fez a análise em função da freqüência de cada espécie nos diferentes meios, foi possível observar que algumas espécies tiveram maior favorecimento em um dos meios empregados, como o caso da *A. encheleia* que 60,0% das cepas isoladas são provenientes do ágar MacConkey (MC), *A. eucrenophila* que 66,6% são provenientes do ágar amido ampicilina (AA) e *A. caviae* que 55,6% são provenientes do ágar sangue ampicilina (SG), como demonstrado na **Tabela 6.**

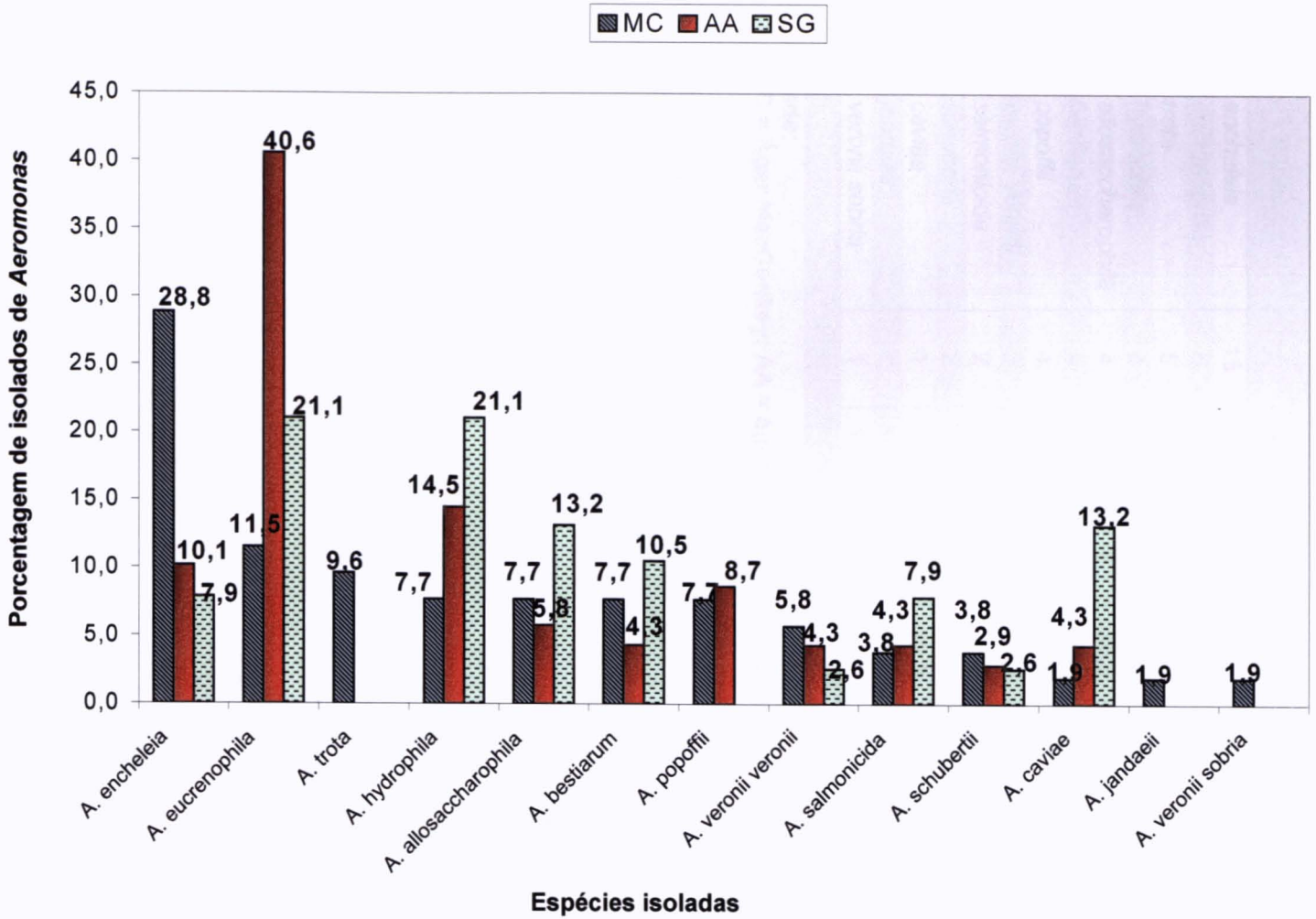

Figura 10: Porcentagem das espécies de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, de acordo com o meio de cultura utilizado, considerando apenas cepas identificadas bioquimicamente, São Paulo, 2004.

Tabela 6: Freqüência de isolamento de espécies de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, segundo meio de cultura utilizado, 2004.

Espécies	MC		AA		SG		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%
A. encheleia	15	60,0	7	28,0	3	12,0	25	100,0
A. eucrenophila	6	14,3	28	66,7	8	19,0	42	100,0
A. trota	5	100,0	0	0,0	0	0,0	5	100,0
A. hydrophila	4	18,2	10	45,5	8	36,4	22	100,0
A. allosaccharophila	4	30,8	4	30,8	5	38,5	13	100,0
A. bestiarum	4	36,4	3	27,3	4	36,4	11	100,0
A. popoffii	4	40,0	6	60,0	0	0,0	10	100,0
A. veronii veronii	3	42,9	3	42,9	1	14,3	7	100,0
A. salmonicida	2	25,0	3	37,5	3	37,5	8	100,0
A. schubertii	2	40,0	2	40,0	1	20,0	5	100,0
A. caviae	1	11,1	3	33,3	5	55,6	9	100,0
A. jandaeii	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0
A. veronii sobria	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0
TOTAL CEPAS IDENTIFICADAS							159	

Onde:
MC = Ágar MacConkey; AA = ágar Amido Ampicilina e SG = Ágar Sangue Ampicilina

4.2. Análise do Perfil Plasmidial

A extração de DNA resultou em 118 (43,2%) cepas que apresentaram pelo menos um plasmídio de baixo peso molecular (até 23 kb).

Levando-se em consideração os plasmídios de alto peso molecular (acima de 23kb), foi possível observar que das 273 cepas isoladas, 84 (30,8%) apresentaram pelo menos um plasmídio de alto peso molecular.

A **Tabela 7** apresenta o número e porcentagem das cepas que apresentaram pelo menos um plasmídio de baixo peso molecular obtidos por amostra.

Tabela 7: Número e porcentagem de cepas de *Aeromonas* isoladas em ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, quanto à presença e ausência de plasmídios de baixo peso molecular (abaixo de 23 kb), 2004.

	Amostra	No. de cepas isoladas	No. de cepas com plasmídio				TOTAL
			P1	% a	P0	% b	
1	Pinheiros	0	0	0,0	0	0,0	0,0
2	Tietê - São Paulo	1	0	0,0	1	100,0	100,0
3	Tietê - Salto	61	42	68,9	19	31,1	100,0
4	Prainha ETE	3	2	66,7	1	33,3	100,0
5	Prainha Parque Municipal	11	11	100,0	0	0,0	100,0
6	Ribeira do Iguape	23	6	26,1	17	73,9	100,0
7	Betari	2	0	0,0	2	100,0	100,0
8	Iporanga - ponto1	54	6	11,1	48	88,9	100,0
9	Iporanga - ponto2	44	17	38,6	27	61,4	100,0
10	Água Suja	4	4	100,0	0	0,0	100,0
11	Santana	41	21	51,2	20	48,8	100,0
12	Iperoig	1	0	0,0	1	100,0	100,0
13	Praia Grande	0	0	0,0	0	0,0	0,0
14	Balneário Flórida	1	0	0,0	1	100,0	100,0
15	Centro	4	0	0,0	4	100,0	100,0
16	Balneário Gaivota	0	0	0,0	0	0,0	0,0
17	Praia José Menino	10	2	20,0	8	80,0	100,0
18	Praia Itararé	3	2	66,7	1	33,3	100,0
19	Mangue do Casqueiro	10	5	50,0	5	50,0	100,0

N = Número de cepas isoladas por amostra;

P1 = Número de cepas que apresentaram 1 ou mais plasmídios;
% a = Porcentagem de cepas que apresentaram 1 ou mais plasmídios;

P0 = Número de cepas que não apresentaram plasmídio;
% b = Porcentagem de cepas que não apresentaram plasmídio.

A quantidade de plasmídios observados nas 273 cepas isoladas dos diferentes pontos de amostragem, variou de 0 a 9 plasmídios de baixo peso molecular por cepa, como apresentado na **Figura 11**.

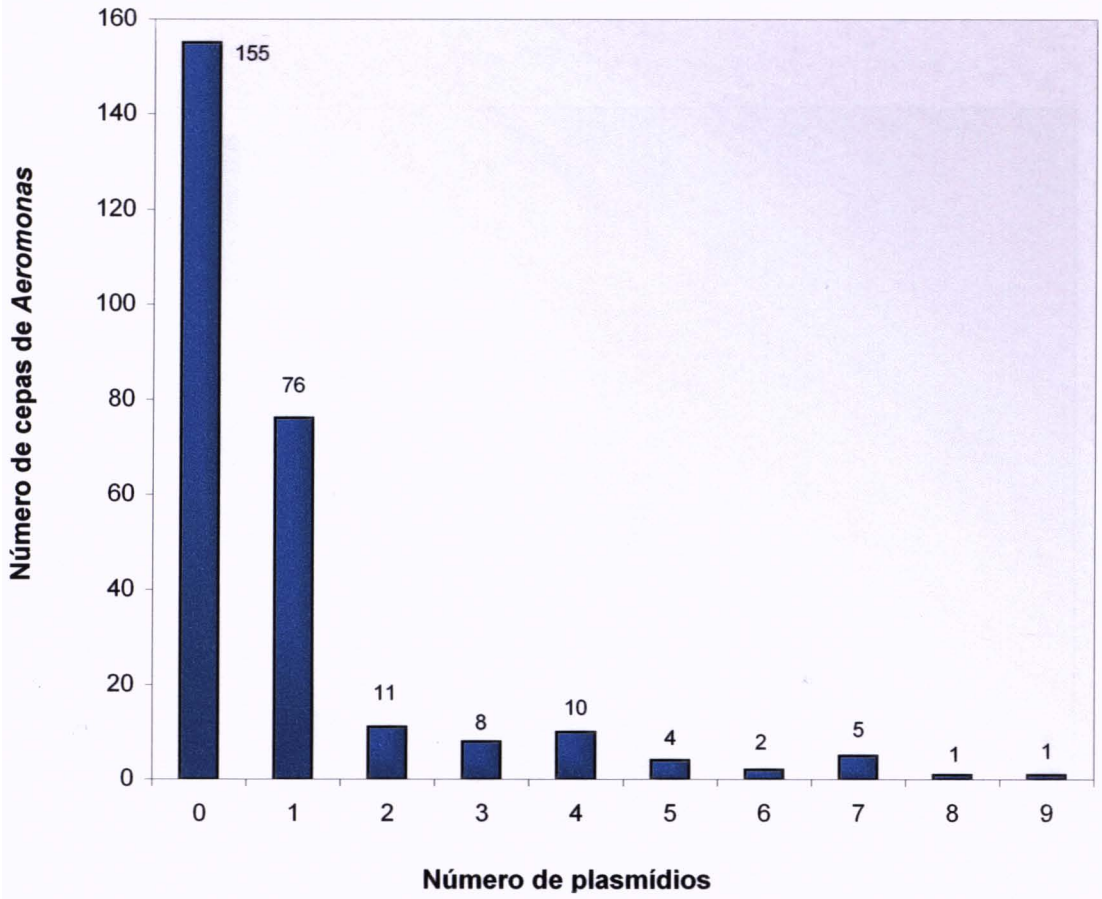

Figura 11: Quantidade de cepas que apresentaram respectivamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 plasmídios de baixo peso molecular, São Paulo, 2004.

4.2.1. Perfil Plasmidial de acordo com os pontos de amostragem

Dentre as 19 amostras de água analisadas, obteve-se 273 cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas*, das quais, 188 (43,2%) apresentaram pelo menos um plasmídio de baixo peso molecular.

Levando-se em consideração o número de cepas que apresentaram pelo menos um plasmídio, por amostra estudada, pôde-se observar que no rio Tietê – Salto (amostra 3), foi o local onde as cepas isoladas apresentaram maior porcentagem de plasmídios, seguido pelos pontos coletados na caverna Santana (amostra 11), ponto 2 do rio Iporanga (amostra 9) e na Prainha da represa Billings (amostra 5), como pode ser observado na **Figura 12**.

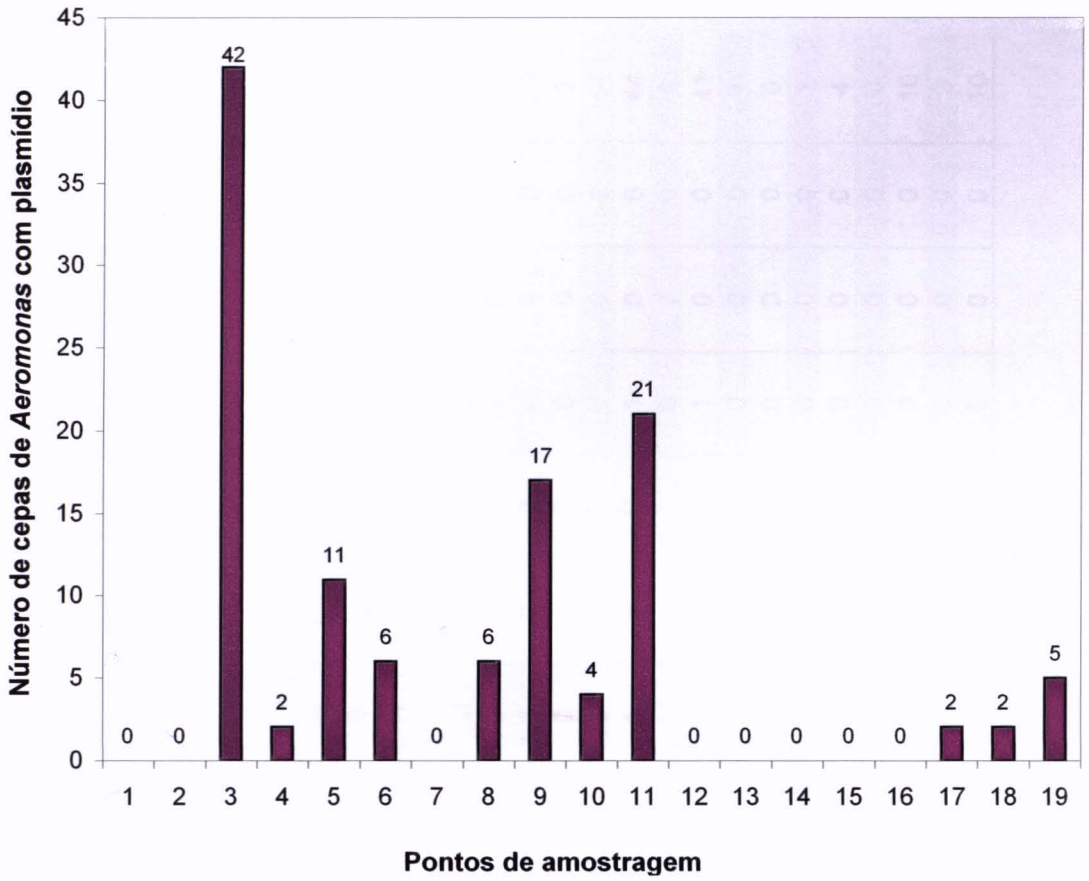

Figura 12: Quantidade de cepas de *Aeromonas* isoladas dos pontos de amostragem estudados, que apresentaram plasmídio de baixo peso molecular, São Paulo, 2004.

A **Tabela 8** demonstra a quantidade de cepas isoladas dos pontos de amostragem, que apresentaram de 0 até 9 plasmídios de baixo peso molecular, onde pode-se observar que o ponto do rio Tietê – Salto (amostra 3) foi o local que apresentou maior quantidade de plasmídio por cepa isolada.

Tabela 8: Freqüência de cepas de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, por ponto de amostragem, que apresentaram zero ou até 9 plasmídios de baixo peso molecular por cepa isolada, 2004.

	Amostra	Número de cepas com plasmídio										TOTAL
		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
1	Pinheiros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Tietê - São Paulo	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	Tietê - Salto	19	28	2	3	4	1	1	2	1	0	61
4	Prainha ETE	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3
5	Prainha Parque Municipal	0	7	0	0	0	1	1	1	0	1	11
6	Ribeira do Iguape	17	0	1	2	3	0	0	0	0	0	23
7	Betari	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
8	Iporanga - ponto1	48	6	0	0	0	0	0	0	0	0	54
9	Iporanga - ponto2	27	8	5	1	1	1	0	1	0	0	44
10	Água Suja	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4
11	Santana	20	16	2	0	1	1	0	1	0	0	41
12	Iperoig	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13	Praia Grande	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	Balneário Flórida	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15	Centro	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
16	Balneário Gaivota	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	Praia José Menino	8	1	0	1	0	0	0	0	0	0	10
18	Praia Itararé	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3
19	Mangue do Casqueiro	5	2	1	1	1	0	0	0	0	0	10

Onde: P0 a P9 = número de plasmídios, de 0 a 9 respectivamente.

A **Tabela 9** demonstra o número e porcentagem de cepas que apresentaram pelo menos um plasmídio de alto peso molecular obtidos por cada amostra analisada, onde pode-se observar que a caverna Santana, foi o local que mais apresentou plasmídios de alto peso molecular.

Tabela 9: Número e porcentagem de cepas de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, que possuem pelo menos um plasmídio de alto peso molecular (acima de 23 kb), 2004.

	Amostra	Total de Cepas isoladas	APM	%
1	Pinheiros	0	0	0,0
2	Tietê - São Paulo	1	0	0,0
3	Tietê - Salto	61	14	23,0
4	Prainha ETE	3	0	0,0
5	Prainha Parque Municipal	11	3	27,3
6	Ribeira do Iguape	23	2	8,7
7	Betari	2	2	100,0
8	Iporanga - ponto1	54	18	33,3
9	Iporanga - ponto2	44	12	27,3
10	Água Suja	4	2	50,0
11	Santana	41	24	58,5
12	Iperoig	1	0	0,0
13	Praia Grande	0	0	0,0
14	Balneário Flórida	1	0	0,0
15	Centro	4	0	0,0
16	Balneário Gaivota	0	0	0,0
17	Praia José Menino	10	2	20,0
18	Praia Itararé	3	2	66,7
19	Mangue do Casqueiro	10	3	30,0

APM = Plasmídio de Alto Peso Molecular.

4.2.2. Perfil Plasmidial das espécies

A **Figura 13** demonstra a quantidade de espécies de *Aeromonas* que apresentaram pelo menos um plasmídio de baixo peso molecular.

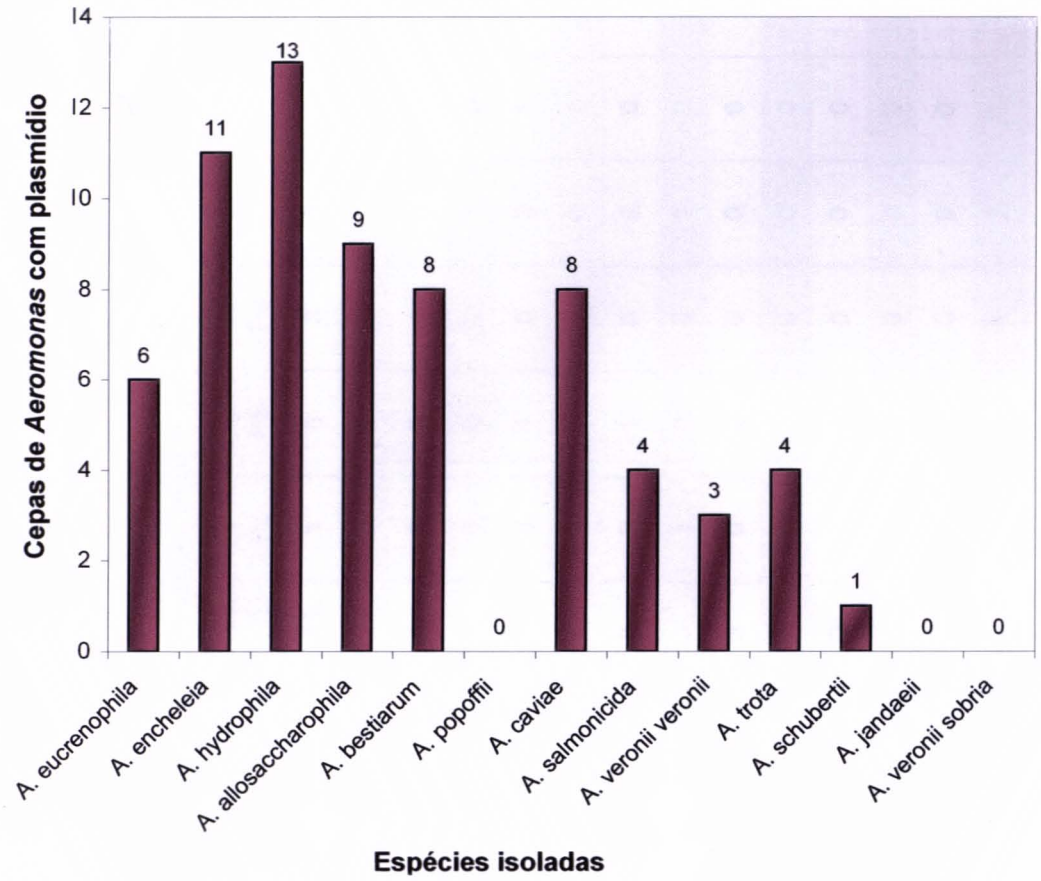

Figura 13: Espécies de *Aeromonas* isoladas de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, que apresentaram pelo menos um plasmídio de baixo peso molecular, 2004.

A **Tabela 10** apresenta o número total de plasmídios de baixo peso molecular, encontrados em cada cepa de *Aeromonas*, por espécie, isoladas de todos os pontos de amostragem.

Tabela 10: Freqüência de plasmídios de baixo peso molecular, observados em cada espécie de *Aeromonas* isolada de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo, 2004.

Espécie	Número de cepas com plasmídio										TOTAL
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
A. eucrenophila	36	3	1	1	1	0	0	0	0	0	42
A. encheleia	14	4	1	2	2	1	0	1	0	0	25
A. hydrophila	9	7	1	1	2	0	1	0	0	1	22
A. allosaccharophila	4	8	0	0	0	0	0	1	0	0	13
A. bestiarum	3	5	1	0	0	1	0	0	1	0	11
A. popoffii	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
A. caviae	1	6	1	0	0	1	0	0	0	0	9
A. salmonicida	4	2	0	0	1	0	0	1	0	0	8
A. veronii veronii	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	7
A. trota	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	5
A. schubertii	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5
A. jandaeii	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A. veronii sobria	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Aeromonas spp	63	35	5	3	4	1	1	2	0	0	114

Onde: P0 a P9 = número de plasmídios, de 0 a 9 respectivamente.

As figuras a seguir apresentam o perfil plasmidial por espécie isoladas dos seguintes pontos de amostragem:

- Rio Tietê – Salto (amostra 3)
- Prainha ETE da Represa Billings – SBC (amostra 4)
- Rio Ribeira do Iguape – Vale do Ribeira (amostra 6)
- Rio Iporanga – Vale do Ribeira (amostra 9)
- Caverna Santana – Vale do Ribeira (amostra 11)

Pode-se observar que o perfil plasmidial não é semelhante entre as espécies.

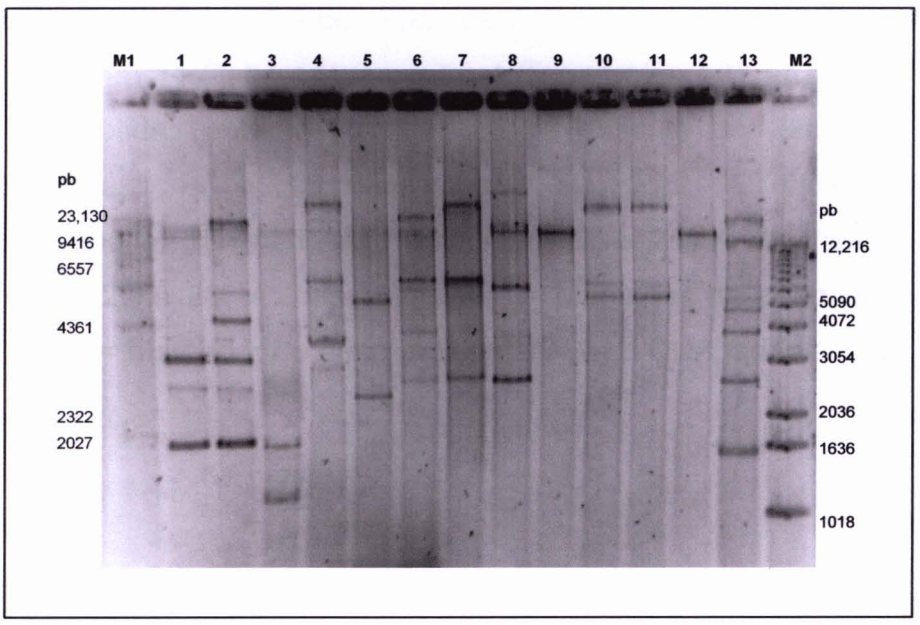

Figura 14: Perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas* isoladas dos seguintes pontos: amostra 9 (linhas 1 – 3); amostra 6 (linhas 4 – 6); amostra 11 (linhas 7 – 12); amostra 3 (linha 13). Obtidas através da metodologia descrita por Birnborn e Doly (1979). Linhas: 1, 2 e 4: *A. encheleia*; 3 e 6: *A. hydrophila*; 5, 7 – 13: *Aeromonas* spp. M1 = Marcador de peso molecular, Hind III; e M2 = Marcador de peso molecular, 1 kb DNA ladder.

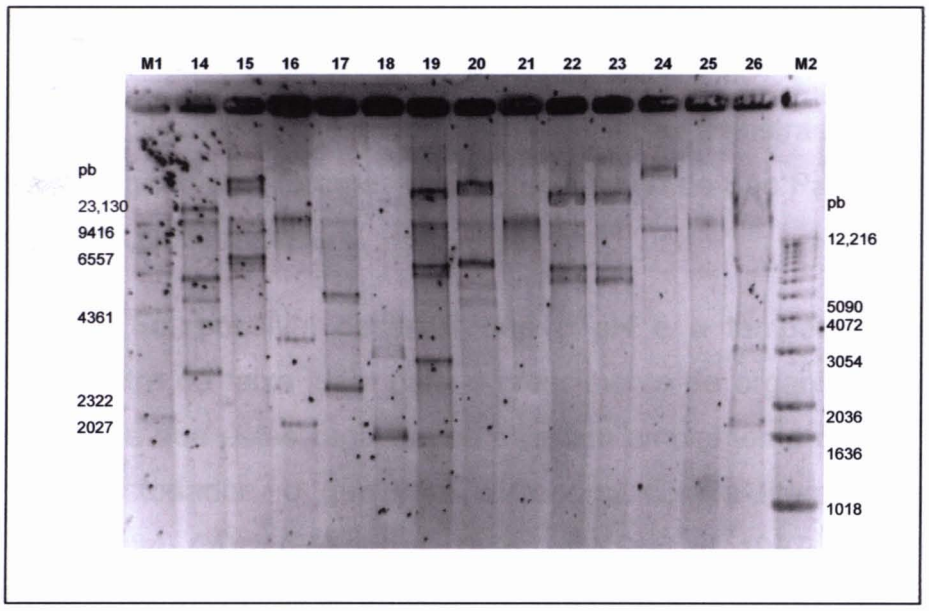

Figura 15: Perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas* isoladas dos seguintes pontos: amostra 11 (linha 14); amostra 4 (linhas 15 – 18); amostra 3 (linhas 19 – 26). Obtidas através da metodologia descrita por Birnborn e Doly (1979). Linhas: 14 e 15: *Aeromonas* spp; 16: *A. caviae*; 17: *A. allosaccharophila*; 18 – 21: *A. hydrophila*; 22 e 23: *A. encheleia*; 24: *A. salmonicida*; 25 e 26: *A. bestiarum*. M1 = Marcador de peso molecular – Hind III e M2 = Marcador de peso molecular – 1 kb DNA ladder.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas amostras de água doce, salobra e salgada de diferentes regiões do Estado de São Paulo, totalizando 19 pontos de amostragem.

Foi possível observar que o pH e a temperatura da água estavam dentro da faixa ideal para o crescimento de organismo do gênero *Aeromonas*, e que estes organismos estavam amplamente distribuídos nos ambientes estudados, o que vem corroborar com a literatura analisada (POPOFF 1984, COLWELL *et al.* 1986, HUYS *et al.* 1997, ESTEVE *et al.* 2003, HARF-MONTEIL *et al.* 2004).

5.1. Qualidade da Água das Amostras Analisadas

O levantamento de dados elaborados pela CETESB (2000a) demonstrou que os ambientes estudados, de um modo geral, apresentaram qualidade da água dentro dos padrões aceitáveis pelos índices de qualidade de água – IQA e balneabilidade.

Dos 19 pontos de amostragem estudados, 14 tiveram o IQA e a balneabilidade determinadas pela CETESB. Dentre esses 14 pontos, foi possível observar que 78,5% dos pontos estudados apresentaram qualidade de água dentro dos índices aceitáveis, e 21,5% estavam com qualidade de água ruim ou péssima.

5.1.1. Região metropolitana de São Paulo

Na região central de São Paulo, foram coletadas amostras dos rios Pinheiros (**Amostra 1**) e Tietê (**Amostra 2**). Tais pontos foram escolhidos para estudar a diversidade de *Aeromonas* neste tipo de ambiente, uma vez que são pontos com visíveis indícios de poluição.

Os levantamentos de dados obtidos na CETESB revelaram que ambos os pontos são ambientes altamente impactados uma vez que as análises realizadas pela CETESB no período da coleta demonstraram possuírem Índices de Qualidade da Água (IQA) péssimos.

5.1.2. Salto

O ponto coletado no rio Tietê (**Amostra 3**) localizado no município de Salto (interior de São Paulo), apresenta menores indícios de poluentes tóxicos, porém apresenta indícios de contaminação fecal, uma vez que nesta região é comum o lançamento no rio de efluentes domésticos sem qualquer tratamento, implicando num aumento significativo de matéria orgânica presente na água.

De acordo com as análises realizadas pela CETESB em 2000, além da qualidade da água estar ruim, os índices de coliformes fecais não estão em conformidade aos padrões de qualidade estabelecidos pela resolução CONAMA 20/86 (CETESB 2000b).

5.1.3. São Bernardo do Campo

A represa Billings é muito utilizada para fins recreacionais pelos moradores da região de Ribeirão Pires em São Bernardo do Campo. A prainha do Parque Municipal (**Amostra 5**) é o local onde se encontra com maior freqüência, pessoas em contato direto com a água, pois é bastante procurado com a finalidade recreativa. O ponto de coleta próximo a Estação de Tratamento de Esgoto - ETE (**Amostra 4**), não é freqüentado por banhistas e por causa de uma barragem neste local, os barcos e "jet-skys", comuns na represa, não chegam próximo a este ponto.

Segundo os dados da CETESB (2000a), os dois pontos estudados na represa possuem ótima qualidade, porém pode-se inferir que o contato dos banhistas com a água, poderia favorecer o aumento da quantidade de matéria orgânica presente na água.

5.1.4. Vale do Ribeira

Nesta região, foram coletadas amostras de água dos rios Ribeira do Iguape (**Amostra 6**), Betari (**Amostra 7**) e Iporanga (**Amostras 8** e **9**) além das cavernas Água Suja (**Amostra 9**) e Santana (**Amostra 10**).

Por ser uma região de Proteção Ambiental, os rios apresentam pouquíssimos indícios de poluição. A CETESB monitora apenas alguns pontos do rio Ribeira do Iguape, cujo IQA na época da coleta foi considerado bom.

Os rios Iporanga e Betari, bem como as cavernas estudadas, não faziam parte da rede de monitoramento da CETESB, e portanto, não apresentam IQA, porém estudos realizados na região do Parque Estadual Turístico do Alto do Ribeira – PETAR, demonstraram que são ambientes com algum tipo de contaminação, mesmo sendo uma área de Proteção Ambiental.

ELFVENDAHL (2000), estudou os rios Betari, Iporanga e Pilões da região do PETAR e detectou a presença de resíduos de pesticidas em todos os pontos estudados (sete no total). A autora fez análise do sedimento e de tecido de peixe coletados nos pontos estudados e detectou 7 e 10, respectivamente, tipos de pesticidas organoclorados (org-Cl) nas amostras de sedimento e em tecidos de peixe, o que comprova a contaminação por pesticidas na região.

MORAES (1999) estudou os rios da região do PETAR e analisou algumas características bioquímicas da água, tais como: pH, alcalinidade, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, concentração de fósforo e nitrogênio e de pesticidas. A autora observou que a região recebe grandes descargas de esgotos domésticos, apesar de ser uma região considerada de proteção ambiental. Mais recentemente, em 2003, a mesma comprovou a diminuição de oxigênio dissolvido na água e acrescentou outra causa de contaminação da região: metais pesados.

Devido às atividades de mineração desde o período colonial até a década de 80, atualmente existem 7 minas de ouro abandonadas e 44 de chumbo e prata, dentro das imediações do PETAR. Estudos em alguns rios da região revelaram altas concentrações de metais no sedimento (MORAES 1999, MORAES 2003).

5.1.5. Litoral Norte e Sul

Foram coletadas amostras de água do mar das seguintes praias: Iperoig (**Amostra 12**) e Praia Grande (**Amostra 13**), localizadas na cidade de Ubatuba, no Litoral Norte; Balneário Flórida (**Amostra 14**), na cidade de Praia Grande, Centro (**Amostra 15**) em Mongaguá, Balneário Gaivota (**Amostra 16**) em Itanhaém, José Menino (**Amostra 17**) em Santos e Itararé (**Amostra 18**) em São Vicente. Ainda no litoral sul, foi coletada amostra de água salobra no Mangue do Casqueiro (**Amostra 19**), localizado na cidade de Cubatão.

Com relação à quantidade, as 7 amostras de água salgada estudadas, apresentaram: 1 com ótima qualidade de água (amostra 13), 1 com boa qualidade (amostra 16) e 5 com qualidade aceitável (amostras 12, 14, 15, 17 e 18). A amostra de água salobra (19), apresentou qualidade ótima. Sendo assim pode-se observar que todas as amostras de água provenientes da região do Litoral Norte e Sul, no ano de 2000, apresentaram índices de qualidade e balneabilidade dentro dos padrões aceitáveis.

5.2. Ocorrência de *Aeromonas* nos Ambientes Estudados

Os organismos do gênero *Aeromonas* têm uma grande distribuição no ambiente aquático e já foram isolados de diversos ambientes aquáticos (POPOFF 1984, COLWELL *et al.* 1986, HOLMES *et al.* 1996, HUYS *et al.* 1997, ESTEVE *et al.* 2003, HARF-MONTEIL *et al.* 2004a, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2004), o que corrobora com os resultados obtidos uma vez que no presente estudo, foi observada a presença de *Aeromonas* em 84,2% dos ambientes estudados.

Os organismos do gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídos no ambiente aquático, porém no Brasil, os estudos com esses organismos são bastante escassos, tornando difícil o conhecimento da sua real prevalência (MATTÉ 1995, FALCÃO *et al.* 1998, BUAB 2000, ROCHA 2004).

O presente estudo confirmou que os organismos do gênero *Aeromonas* podem ser encontrados em água com ótimas ou péssimas condições. Estes organismos foram encontrados em águas com pH variando de ácido (6,2) a alcalino (8,5), e com temperatura entre 19 e 29°C, e foram encontrados em água doce, salobra e salgada, o que comprova mais uma vez, a afirmação de que estes organismos possuem uma ampla distribuição no ambiente aquático, independente da salinidade, temperatura e pH (POPOFF, 1984; COLWELL *et al.*, 1986; VADIVELU *et al.*, 1991; SINGH & SANYAL, 1992 a,b,c,d; LOEWY *et al.*, 1993; SINGH & SANYAL, 1993; SINGH *et al.*, 1993; MATTÉ *et al.*, 1996; HOLMES *et al.*, 1996; HUYS *et al.*, 1997; IVANOVA *et al.*, 2001; MESSI *et al.*, 2002; OMS, 2002; MAALEJ *et al.*, 2003).

Alguns autores inferem que *Aeromonas* possui uma grande diversidade uma vez que estes organismos apresentam preferência por ambientes com alta taxa de matéria orgânica (KHARDORI & FAINSTEIN 1988, MONFORT & BALEUX 1990, KIROV 1993, MATTÉ *et al.* 1996, GAVRIEL *et al.* 1998, MASSA *et al.* 2001).

Na figura 7, pode-se observar a porcentagem de isolamento de cepas de *Aeromonas* por região estudada. É possível observar que a região do Vale do Ribeira apresentou o maior percentual de isolamento, seguida da região de Salto. Vale ressaltar que no Vale do Ribeira foram coletadas 6 amostras, enquanto que em Salto, foi coletada apenas uma amostra. Sendo assim, podemos inferir que apesar do percentual de isolamento ser maior no Vale do Ribeira, não significa que este seja um dado real.

Os resultados obtidos nos pontos na região do Vale do Ribeira, quando comparados com os obtidos nos outros pontos estudados, indicam que esta região foi onde ocorreu a maior quantidade de cepas de *Aeromonas* isoladas, uma vez que perfizeram 61,5% das cepas isoladas (Figura 7).

Os pontos coletados no rio Iporanga foram os que apresentaram maior quantidade de cepas de *Aeromonas* isoladas, com 98 cepas, seguidos pelos rios Ribeira do Iguape com 23 e Betari com 2 cepas isoladas. Os rios Iporanga e Ribeira do Iguape são os rios que mais recebem efluentes domésticos da região, o que implica num aumento significativo de matéria orgânica, e teria favorecido o crescimento de *Aeromonas*.

O rio Betari, por sua vez, fica afastado da cidade, e não recebe efluentes domésticos como os demais, sendo assim, era se esperar que neste local, não houvesse quantidades significativas de cepas de *Aeromonas*.

A coleta nas cavernas foi feita no rio Betari, que atravessa ambas as cavernas estudadas.

A caverna Água Suja não é habitada por morcegos, e apesar de seu nome, possui águas cristalinas. Esse ponto apresentou poucas cepas de *Aeromonas*, em compensação, a caverna Santana é habitada por morcegos e apresentou um aumento significativo no número de cepas isoladas, dessa maneira, pode-se inferir que a presença de guano (fezes de morcego) na água, poderia ter provocado um aumento na diversidade de *Aeromonas* nessa amostra.

Vale ressaltar ainda que este estudo é pioneiro neste tipo de ambiente, pois até então, nunca havia sido relatada a presença de *Aeromonas* em água de ambientes de cavernas.

A região de Salto, amostra 3 do rio Tietê foi o local onde ocorreu o maior número de cepas isoladas (61) pertencentes ao gênero *Aeromonas* (Figura 6) e onde houve maior diversidade de espécies: 9 das 19 espécies descritas na literatura foram encontradas neste local. Este local apresentou fortes índices de poluição através de contaminação por esgoto doméstico. Com tais resultados pode-se inferir que a matéria orgânica presente na água poderia ter sido a principal responsável pela quantidade e variedade de organismos isolados deste local.

ARAÚJO *et al.* (1991) isolaram *Aeromonas* spp em água com diferentes graus de poluição: esgoto urbano, lagos eutróficos, rios e praias. A espécie mais freqüente foi *A. caviae* que estava presente em águas com alto grau de poluição e em esgotos. *A. hydrophila* foi isolada em água com baixo teor de poluição fecal e *A. sobria* em águas sem poluição fecal. Estes resultados são contrários aos obtidos no presente estudo, no qual foi possível isolar *A. hydrophila* na amostra do rio Tietê de Salto, local este considerado pela CETESB bastante poluído.

O presente estudo demonstrou que *A. hydrophila* foi isolada tanto de água limpa quanto água poluída (Tabela 4), o que corrobora com os resultados obtidos por KERSTERS *et al.* (1996) que analisaram amostras de águas superficiais e potáveis na Bélgica, observando esta espécie em ambas.

Os organismos do gênero *Aeromonas* podem crescer em ambientes com salinidade variando de 0 a 4%, porém sua ocorrência em água do mar é menor quando comparada à família *Vibrionaceae* (MATEOS *et al.* 1992, LOEWY *et al.* 1993). Os dados literários vêm corroborar com os resultados obtidos referentes às amostras de Ubatuba, Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém e São Vicente, onde foram encontradas poucas cepas de organismos do gênero *Aeromonas* (Figura 6).

BRANDI *et al.* (1999) estudaram a habilidade de sobrevivência de *Aeromonas* spp em diferentes tipos de água, dentre elas, mineral e torneira (clorada) e em água do mar. As amostras foram contaminadas com cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*. Os autores concluíram que as três espécies pesquisadas, sobreviveram por um longo período (mais de 72 horas) na água mineral, enquanto que em água de torneira, seu período de sobrevivência foi menor (cerca de 48 horas). Já as cepas de *Aeromonas* provenientes da água do mar, apresentaram uma redução de 90% após 2 dias. Os autores comprovaram que estes microrganismos são mais sensíveis à água do mar do que à água clorada. Esse estudo corrobora com os dados literários uma vez que os organismos pesquisados tiveram um baixo crescimento em amostras de água salgada.

Resultados contrários aos esperados foram verificados no ponto de amostragem localizado na praia José Menino em Santos, onde ocorre o lançamento de águas residuárias. O fato de existir cargas poluidoras no ponto em questão, poderia ter alterado as características físico-químicas dessa água, como por exemplo, salinidade, pH e quantidade de matéria orgânica. Essas alterações poderiam ter favorecido o aporte de organismos do gênero *Aeromonas* ou ainda ter favorecido o crescimento desses, que já estariam presentes na água do mar, promovendo um aumento significativo neste local.

CAVALLO *et al.* (1999) estudaram a viabilidade de bactérias heterotróficas na água e no sedimento do Mar Piccolo em Toronto na Itália. Os autores relataram que este mar recebe volumes consideráveis de esgoto e esgoto industrial, e observaram que *Aeromonas* spp foi a bactéria Gram-negativa mais predominante no estudo, tendo sido isolada entre 27 a 35% das amostras. Os autores concluíram que por se tratar de um ambiente com altos índices de poluição fecal, teria favorecido o crescimento de organismos do gênero *Aeromonas*. Esses resultados de CAVALLO *et al.* (1999) são similares com os resultados obtidos na amostra da Praia José Menino em Santos, onde houve um aumento significativo desses isolados.

Como citado anteriormente, o aporte de matéria orgânica poderia ter acarretado um aumento no número de organismos do gênero *Aeromonas* na Praia José Menino em Santos, uma vez que alguns autores estudaram a presença de *Aeromonas* em águas residuárias e verificaram que estes organismos podem ocorrer com freqüência nesse tipo de água. (MONFORT e BALEUX 1990, BOUSSAID *et al.* 1991, BAHLAOUI *et al.* 1997, ROCHA 2004).

O mangue possui água salobra, o que favorece o crescimento de organismos do gênero *Aeromonas* (POPOFF 1984, LOEWY *et al.* 1993). No presente estudo, foi observado que no Mangue do Casqueiro foram isolados apenas 10 cepas de *Aeromonas* (Figura 6). Uma vez que a água salobra pode favorecer o crescimento desses organismos, poderia se esperar que neste local houvesse um maior isolamento de *Aeromonas*, o que não foi observado nos resultados deste estudo.

Em comparação com os outros pontos estudados, a Represa Billings, de um modo geral, apresentou uma baixa quantidade de cepas de *Aeromonas* spp (Figura 7). Segundo os dados da CETESB (2000), os dois pontos estudados na represa possuem ótima qualidade. Sendo assim os resultados obtidos nestes pontos estão de acordo com os esperados, demonstrando que tais organismos podem ser encontrados em ambientes com água de ótima qualidade, mesmo que em menores quantidades (POPOFF 1984, COLWELL *et al.* 1986, HUYS *et al.* 1997, ESTEVE *et al.* 2003).

Com relação aos diferentes tipos de água que são utilizadas para fins recreacionais, deve-se levar em conta a associação entre a presença de espécies de *Aeromonas* spp nesses ecossistemas, a capacidade de produção de fatores de virulência pelo microrganismo e a presença de fatores predisponentes do hospedeiro (MATTÉ 1995).

Indivíduos imunodeprimidos ou que apresentam lesões resultantes de ferimentos na superfície do corpo, podem estar sujeitos a infecções ocasionadas tanto por ingestão desta água, quanto pelo contato direto das partes lesadas com a água contaminada por *Aeromonas* spp.

FRANCO *et al.* (1990), na Argentina, estudando a sobrevivência de microrganismos patogênicos em águas recreacionais, utilizando para isso cepas padrão, observaram, *in vitro*, a sobrevivência dessas cepas quando submetidas a diferentes temperaturas, destacando esse fator como o mais importante para a sobrevivência bacteriana. A cepa mais resistente a essas variações de temperatura foi *A. hydrophila*, apontando assim um grande problema para a população. No presente estudo, foi isolada apenas uma cepa de *A. hydrophila* proveniente da amostra Represa Billings, que também é utilizada para fins recreacionais.

Após a análise de 64 amostras de água de superfície e 24 amostras de sedimento, provenientes da Represa Guarapiranga, MATTÉ (1995) encontrou algumas espécies do gênero *Aeromonas*, dentre elas: 18,7% de *A. hydrophila*, 31,2% de *A. caviae*, 43,7% de *A. sobria* e 76,6% de *A. jandaeii*. No presente estudo, ao analisar a amostra da Represa Billings, observou-se o isolamento de 35,7% de *A. caviae*, 14,3% de *A. bestiarum*, 14,3% de *A. allosaccharophila*, 7,2% de *A. veronii veronii* e 7,2% de *A. hydrophila*. Comparando os resultados obtidos no presente estudo com os obtidos por MATTÉ (1995), pode-se observar a variação das espécies encontradas, demonstrando assim, a diversidade dos organismos de *Aeromonas* spp.

Águas poluídas são de grande importância quando se estuda a sobrevivência de *Aeromonas* spp no ambiente aquático pois, estas podem representar uma forte contaminação para as águas superficiais (MONFORT e BALEUX 1990).

Os rios Pinheiros e Tietê apresentaram péssima qualidade de água, sendo assim, poderia se esperar que nesse tipo de ambiente, não ocorresse crescimento significativo de *Aeromonas.* Os resultados obtidos na presente pesquisa confirmam esta observação, onde nenhuma espécie de *Aeromonas* foi encontrada na amostra do rio Pinheiros e na amostra do rio Tietê, apenas uma, embora as provas bioquímicas não tenham permitido determinar sua posição taxonômica específica.

SEIDLER *et al.* (1980) isolaram *Aeromonas* spp de águas poluídas. De um total de 17 cepas estudadas, 9 eram *A. sobria* e 4 *A. hydrophila*. Os resultados obtidos no presente estudo não estão de acordo aos da literatura, uma vez que o rio Pinheiros e rio Tietê, ambos em São Paulo, apresentaram uma cepa pertencente ao gênero *Aeromonas*, não sendo possível determinar sua real classificação taxonômica uma vez que apresentou características bioquímicas atípicas.

5.2.1. Diversidade das espécies de *Aeromonas* isoladas nos ambientes estudados

A taxonomia dos organismos do gênero *Aeromonas* é bastante complexa, uma vez que as espécies podem ser agrupadas levando em consideração suas características fenotípicas e genotípicas (POPOFF 1984, COLWELL *et al.* 1986, CARNAHAN e JOSEPH 1991, BOTARELLI e OSSIPRANDI 1999). Devido às variações nas características fenotípicas, CARNAHAN (1993) definiu este gênero como "a sea of change" (um mar de mudanças).

JOSEPH e CARNAHAN (2000) concluíram que as características bioquímicas desses microrganismos podem variar de acordo com a fonte de isolamento ou com aspectos geográficos, favorecendo sua variabilidade e dificultando a posicionamento taxonômico dos isolados.

Este estudo demonstrou que, além dos organismos do gênero *Aeromonas* estarem presentes na maioria dos ambientes estudados, houve uma grande diversificação de espécies, das 13 espécies de *Aeromonas*, isoladas em maior freqüência foram: *A. eucrenophila* (42 cepas), *A. encheleia* (25 cepas) e *A. hydrophila* (22 cepas), e as com menor freqüência foram: *A. veronii sobria* e *A. jandaeii*, que tiveram cada, uma única cepa isolada (Tabela 2).

Foram encontradas ao todo, 42 cepas de *A. eucrenophila* neste estudo, demonstrando assim que dentre os ambientes estudados, esta foi a espécie mais abundante no ambiente aquático. Estas cepas foram isoladas dos seguintes locais: rio Tietê em Salto, dos rios Betari e ponto 1 do rio Iporanga, e da caverna Santana localizados no Vale do Ribeira, e no Mangue do Casqueiro, em Cubatão.

As 25 cepas isoladas de *A. encheleia* foram provenientes dos seguintes pontos de amostragem: rio Tietê em Salto, rio Ribeira do Iguape e pontos 1 e 2 do rio Iporanga, localizados no Vale do Ribeira, e no Mangue do Casqueiro em Cubatão.

As 22 cepas de *A. hydrophila* foram isoladas do rio Tietê em Salto, da Prainha do Parque Municipal, da represa Billings, do rio Ribeira do Iguape e do ponto 2 do rio Iporanga, localizados no Vale do Ribeira.

As espécies que foram isoladas em menores proporções foram *A. veronii sobria* e *A. jandaeii*, tendo sido isolada apenas uma cepa de cada espécie.

Embora neste estudo não tenha sido realizada a pesquisa de fatores de virulência nos isolados de *Aeromonas*, observou-se que algumas espécies isoladas (*A. hydrophila, A. caviae, A. veronii veronii, A. schubertii, A. jandaeii* e *A. veronii sobria*) são classificadas como pertencentes ao grupo das cepas potencialmente patogênicas para o homem (JOSEPH *et al.* 1991,

JANDA e ABBOTT 1998, ABBOTT *et al.* 2003), podendo implicar então, um risco à Saúde Pública.

Os organismos com características fenotípicas atípicas, foram classificados como *Aeromonas* spp, e representaram neste estudo, 41,8% dos isolados. Muitos pesquisadores tiveram essa mesma dificuldade na classificação de isolados de *Aeromonas* provenientes de diferentes origens (MONFORT e BALEUX 1990, MARTINEZ-MURCIA *et al.* 1992, MATTÉ 1995, ASHBOLT *et al.* 1995, HARF-MONTEIL *et al.* 2004, ROCHA 2004).

Devido à taxonomia controversa e à proximidade fenotípica das espécies deste grupo de organismos, muitos estudos baseados somente nas espécies descritas por POPOFF (1984), foram utilizados para classificar cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras ambientais mesmo quando novas espécies já haviam sido descritas (FALCÃO *et al.* 1998). Isso dificulta o real conhecimento da diversidade das espécies de *Aeromonas*, prejudicando também a comparação dos resultados obtidos com os resultados de outros trabalhos pesquisados na literatura.

5.3. Isolamento de *Aeromonas* de Acordo com os Meios de Cultura Empregados

No presente estudo, foram isoladas 273 cepas de *Aeromonas* spp onde pôde-se observar que a freqüência dos isolados nos três meios de cultura não apresentou uma variação significativa, uma vez que a porcentagem dos isolados provenientes do ágar MacConkey foi igual à porcentagem dos isolados do ágar amido ampicilina, que foi de 36,6% para cada um dos meios em questão. A porcentagem dos isolados no ágar sangue ampicilina foi de 26,2%.

Porém, ao analisar apenas as espécies que tiveram uma posição taxonômica definida quanto à espécie, pôde-se observar que o ágar amido ampicilina foi mais eficiente no isolamento das *Aeromonas* identificadas (Figura 9).

Observou-se em relação ao tipo de ágar: amido ampicilina, MacConkey e sangue ampicilina que foram eficientes no isolamento de respectivamente *A. eucrenophila*, *A. encheleia* e *A. hydrophila* (Figura 10).

HICKMAN-BRENNER *et al.* (1987) isolaram *A. veronii veronii* de amostras clínicas. O meio de cultivo que comumente se isola esta espécie é o ágar sangue ampicilina. No presente estudo, 42,9% de *A. veronii veronii* foram isolados no ágar MacConkey e no ágar amido ampicilina em iguais proporções, e 14,3% em ágar sangue ampicilina, dessa maneira este estudo demonstra que esta espécie pode ser isolada de diferentes meios e não apenas no ágar sangue ampicilina.

Até o presente momento, *A. allosaccharophila* nunca havia sido isolada em amostra ambiental e no meio ágar sangue ampicilina. Na presente pesquisa, 38,5% das cepas de *A. allosaccharophila* foram isoladas no ágar sangue ampicilina, sendo este inclusive, o melhor meio para o isolamento desta espécie neste estudo. Dessa maneira, os dados demonstram que este estudo é pioneiro ao isolar *A. allosaccharophila* de amostras ambientais.

A espécie *A. hydrophila* já foi isolada tanto de amostras clínicas quanto ambientais, sendo as amostras clínicas as mais freqüentes (HAVELAAR *et al.* 1992, KIROV 1993, CARSON *et al.* 2001, CHOURET *et al.* 2001). MATTÉ (1995) isolou *A. hydrophila* em 18,7% das amostras de água doce, utilizando o ágar sangue ampicilina para o isolamento. Ainda que neste estudo também tivesse sido usado o ágar sangue ampicilina, MATTÉ (1995) obteve de água doce, resultados bem inferiores (18,7% contra 36,4%) quando comparados com os obtidos.

Uma constante problemática no estudo da diversidade de *Aeromonas* é o emprego de diferentes meios de cultura, uma vez que estes organismos podem apresentar características bioquímicas variáveis dependendo do local isolado (JOSEPH e CARNAHAM 2000), sendo assim o grande número de meios de cultura que já foram empregados para o

isolamento desses organismos, dificulta a comparação entre os resultados, e principalmente a elucidação da real distribuição das espécies nos diferentes ambientes aquáticos (PALUMBO *et al.* 1985, MATTÉ 1995, FALCÃO *et al.* 1998, CAVALLO *et al.* 1999).

5.4. Análise do Perfil Plasmidial das espécies de *Aeromonas*

Alguns autores salientam que os plasmídios podem codificar uma ampla variedade de determinantes genéticos, que permitiram que seu hospedeiro sobreviva melhor em um ambiente adverso ou mesmo competir com outros organismos, e que podem estar associados à produção de toxinas, resistência à antibióticos ou metais pesados, ou ainda estar relacionados com a rápida transferência de material genético entre as comunidades microbianas (DARBRE 1989, BROCK *et al.* 1994, MATTÉ 1996, BROWN *et al.* 1997, KHACHATOURIANS 1998, BAUAB 2000).

Analisando-se o número de cepas que apresentaram pelo menos um plasmídio, provenientes dos pontos estudados, foi possível observar que a maioria destas cepas são provenientes dos locais onde o índice de qualidade da água foi considerado aceitável ou ruim (Tabela 7 e Quadro 2). Estes resultados corroboram com a literatura uma vez que os plasmídios podem conferir resistência à ambientes adversos (BROCK *et al.* 1994, BROWN *et al.* 1997, BAUAB 2000).

Observou-se que nas cepas que apresentaram plasmídios, houve uma variação de 1 a 9 plasmídios por cepa isolada. Outros autores também pesquisaram a presença de plasmídios em cepas de *Aeromonas*, mas até o presente momento, nunca havia sido encontrado até 9 plasmídios numa mesma cepa (BELLAND e TRUST 1988, KELLY e KAIN 1991, GILES *et al.* 1995, MATTÉ 1996, ROCHA 2004).

MATTÉ (1996) fez a análise do perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas* isoladas da Represa de Guarapiranga no Estado de São Paulo e observou que 25% das cepas analisadas possuíam pelo menos um plasmídio. Comparando-se os resultados obtidos por MATTÉ (1996) com os do presente estudo, observou-se que o número de cepas que continham pelo menos um plasmídio foi significativamente maior, uma vez que neste estudo, foi possível observar que 76,9% das espécies isoladas apresentaram pelo menos um plasmídio. Vale lembrar que MATTÉ (1996) analisou apenas um ambiente e que neste estudo, foram analisados 19 ambientes diferentes, sendo assim poderia se esperar um aumento no número de cepas com pelo menos um plasmídio uma vez que o número de amostras analisadas e o número de cepas isoladas neste estudo foram significativamente maior.

Comparando os resultados obtidos neste estudo com os resultados obtidos por ROCHA (2004) que também analisou o perfil plasmidial de organismos do gênero *Aeromonas* isolados em um sistema de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização localizado no Estado de São Paulo, onde observou que 83% das cepas isoladas apresentaram pelo menos um plasmídio, pode-se perceber que a porcentagem de cepas contendo pelo menos um plasmídio foi ligeiramente maior do que no presente estudo. Porém, levando-se em consideração que ROCHA (2004) analisou apenas 70 cepas de *Aeromonas* spp e por se tratar de um sistema de tratamento de desinfecção de esgoto por hipoclorito de sódio, era de se esperar que o número de cepas com plasmídios fosse maior por se tratar de um ambiente com fatores abióticos adversos às *Aeromonas*. E como já descrito na literatura, em ambientes adversos, podem ser encontrados com maior facilidade, organismos que contenham plasmídios (BROCK *et al.* 1994, BROWN *et al.* 1997, BAUAB 2000).

Alguns autores, ao analisar o perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas* spp, observaram que as espécies distintas não possuem um padrão de perfil plasmidial específico. Os autores concluem que o perfil plasmidial está mais associado ao tipo de ambiente em que os organismos se encontram (BROCK *et al.* 1994, MATTÉ 1996, BROWN *et al.* 1997, BAUAB 2000, ROCHA 2004). Estes dados literários corroboram com o presente estudo, uma vez que não foi possível observar uma relação entre o perfil plasmidial e as espécies isoladas. Observou-se também que dependendo do ambiente estudado, as cepas isoladas apresentaram uma variação no número de plasmídios encontrados (Figura 12 e Tabela 8).

BELLAND e TRUST (1988) estudaram o perfil plasmidial de cepas de *A. salmonicida* com características típicas e atípicas. Os autores observaram que essas cepas apresentaram de um a quatro plasmídios e sugerem que este perfil plasmidial poderia ser uma ferramenta útil como marcador epidemiológico dessas espécies. No presente estudo, pôde-se observar que 50% das cepas de *A. salmonicida* isoladas apresentaram de um até sete plasmídios, demonstrando assim um número bastante expressivo no número de plasmídios que essa espécie pode conter.

GILES *et al.* (1995) também estudaram o perfil plasmidial de cepas de *A. salmonicida* e observaram que estas apresentaram no máximo 6 plasmídios. Os autores não observaram correlação entre a presença destes plasmídios com a resistência aos antibióticos, uma vez que o cultivo na ausência ou presença destes, não revelou diferenças no perfil plasmidial encontrado.

VADIVELU *et al.* (1995) observaram a presença de plasmídio em cepas de *A. hydrophila* isoladas de casos de bacteremia e verificaram que de todas as cepas estudadas apenas uma não apresentou plasmídio. Por se tratar de uma amostra clínica, os autores inferem que os plasmídios encontrados nessa espécie poderiam codificar fatores de virulência que teriam levado à infecção por essas bactérias.

MATTÉ (1996) analisou o perfil plasmidial de 15 cepas do gênero *Aeromonas* onde pôde verificar que 13,4% das *A. hydrophila*, 33,3% das *A. sobria* e 53,3% das *A. jandaeii* apresentaram pelo menos um plasmídio e não foi observada a presença desses elementos extracromossômicos nas cepas de *A. caviae*. Diante dos dados obtidos, a autora infere que o perfil plasmidial encontrado poderia estar relacionado com as espécies, uma vez que ocorreu uma pequena diferença entre o número de bandas nas diferentes espécies isoladas.

No presente estudo observou-se que 59,1% das *A. hydrophila* e 88,9% das *A. caviae* isoladas apresentaram pelo menos um plasmídio. A presença de plasmídio não foi observada nas cepas de *A. jandaeii* e tampouco de *A. veronii sobria* (nova nomenclatura – antiga *A. sobria*). Entretanto, os resultados da atual pesquisa não podem ser comparados aos de MATTÉ (1996) uma vez que as cepas isoladas apresentaram um perfil plasmidial diferente.

ROCHA (2004) estudou o perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas* provenientes de sistemas de desinfecção por cloro, de estações de tratamento de esgoto de Lins – SP, verificou a presença de plasmídio nas seguintes espécies: *A. media*, *A. trota*, *A. caviae*, *A. veronii sobria*, *A. allosaccharophila*, *A. jandaeii*, *A. bestiarum*, *A. eucrenophila* e *A. encheleia*. Quando comparados os resultados obtidos por ROCHA (2004), com os do presente estudo, pode-se observar que ocorreu uma variação no perfil plasmidial das cepas encontradas, uma vez que as espécies encontradas em ambos estudos, apresentaram diferentes números de plasmídio por cepa estudada. No presente estudo foi observada a presença de pelo menos um plasmídio na maioria das espécies isoladas, exceto *A. veronii sobria*, *A. jandaeii* e *A. popoffii*, que apresentaram nenhum plasmídio.

Levando-se em consideração que os plasmídios podem ser responsáveis pela manutenção de microrganismos no ambiente, favorecendo sua adaptação, poderíamos considerar que esses elementos estariam favorecendo a presença de *A. hydrophila*, *A. encheleia* e *A.*

allosaccharophila, uma vez que estas espécies foram as que apresentaram maior número de plasmídios (Figura 13) e que foram ao mesmo tempo, isoladas com maior freqüência dos ambientes estudados.

Uma vez que os organismos do gênero *Aeromonas* são habitantes naturais do ambiente aquático, e fazem parte da flora de várias espécies de animais, e além disso, podem ser patogênicas para o homem (POPOFF 1984, COLWELL *et al.* 1986, HOLMES *et al.* 1996, HUYS *et al.* 1997, ESTEVE *et al.* 2003, HARF-MONTEIL *et al.* 2004a, MIÑANA-GALBIS *et al.* 2004), o estudo do perfil plasmidial desses organismos é de extrema importância uma vez que esses elementos extracromossômicos, podem estar associados à uma série de toxinas, entre outros fatores de virulência, podendo ser dessa maneira, prejudiciais ao homem (BROCK *et al.* 1994, MATTÉ 1996, ROCHA 2004).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e na análise da literatura, pode-se concluir que:

✓ Os organismos do gênero *Aeromonas* possuem uma grande diversidade nos corpos hídricos de água doce de São Paulo, porém em águas salgadas, revelaram uma baixa diversidade;

✓ Os organismos do gênero *Aeromonas* estão presentes tanto em água limpa quanto poluída, e a matéria orgânica presente na água, pode favorecer seu crescimento;

✓ Algumas espécies encontradas neste estudo são potencialmente patogênicas, tanto para o homem quanto para os animais aquáticos;

✓ Os meios de cultivo empregados apresentam uma especificidade em relação às espécies isoladas;

✓ O presente estudo permitiu verificar o primeiro relato da presença de cepas de *Aeromonas* isoladas em água de ambientes de cavernas;

✓ A espécie *A. allosaccharophila*, nunca havia sido isolada em amostras ambientais;

✓ Foi verificada a presença de plasmídios em 43,2% das cepas de *Aeromonas* spp analisadas;

✓ Locais muito impactados, apresentaram número mais elevado de cepas de *Aeromonas* com pelo menos um plasmídio;

✓ O perfil plasmidial das cepas isoladas, não está relacionado à espécie de *Aeromonas*, mas ao local em que esses microrganismos foram isolados.

7. RECOMENDAÇÕES

Com base nas conclusões deste trabalho, e considerando que o risco de infecção com espécies de *Aeromonas* potencialmente patogênicas, está associado com a presença de fatores de resistência do hospedeiro, com o uso recreacional do ambiente aquático e com a utilização destes mananciais como reservatório de água para o tratamento e abastecimento público, recomenda-se que:

✓ A pesquisa de *Aeromonas* spp seja estendida para outros ambientes aquáticos, não só em São Paulo, a fim de estabelecer sua real distribuição, ecologia e taxonomia, o que viria a contribuir para a determinação da sua biovariedade;

✓ Seja feito um alerta para as populações bem como para as Companhias de Saneamento, sobre os riscos para a Saúde Pública ao ter contato com ambientes contaminados por *Aeromonas* spp, por ser este, um organismo potencialmente patogênico para o homem.

✓ Pacientes portadores de fatores predisponentes, ou imunodeprimidos, sejam orientados a evitar o contato com ambientes e alimentos que possam ser vias de transmissão destes organismos, uma vez que estão amplamente distribuídos em vários tipos de ambientes;

✓ Que sejam feitos mais estudos no campo da biologia molecular, uma vez que esses organismos apresentam uma série de fatores de virulência e resistência à antibióticos, fazendo com que o conhecimento sobre esses organismos seja cada vez maior.

8. REFERÊNCIAS

Abbot SL, Cheung WKW & Janda JM. The genus Aeromonas: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **J Clin Microbiol, 41**(6): 2348-57, 2003.

Abbot SL, Cheung WKW, Kroske-Bystrom S, Malekzadeh T & Janda JM. Identification of *Aeromonas* strains to genospecy level in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol, 30**(5): 1262-6, 1992.

Alabi SA & Odugbemi T. Biochemical characteristics and simple scheme for the identification of *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides* in patients with and without diarrhoea in Lagos, Nigeria. **J Med Microbiol, 32**: 45-8, 1990.

Ali A, Carnahan AM, Altwegg M, Lüthy-Hottenstein J & Joseph SW. *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (Formerly Genomospecies DNA Group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non- human sources. **Med Microbiol Let, 5**: 156-65, 1996.

Alonso JL, Amoros I & Alonso MA. Differential Susceptibility of Aeromonads and Coliforms to cefsulodin. **J Appl Environ Microbiol, 62**(6): 1885-1888, 1996.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 20th ed., APHA. AWWA, WEF, Washington, 2000.

Araújo RM, Arribas RM, Pares R. Distribution of *Aeromonas* species in waters with diferents levels of pollution. **J Appl Bacteriol, 71**: 182-6,1991.

Ashbolt NJ, Ball A, Dorsch M, Turner C, Cox P, Chapman A, Kirov SM. The identification and human health significance of environmental aeromonads. **Wat Sci Tech, 31**(5-6): 263-9, 1995.

Ashdown LR & Koehler J. The spectrum of *Aeromonas*- associated diarrhea in tropical Queens land, Australia. **Southeast Asian J Trop Med Public Health, 24**(2): 347-53, 1993.

Atlas RM & Bartha R.**Microbiol ecology, fundamentals and applications.** The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. 3ª ed., 1993.

Atlas RM, Sayler G, Burlage RS & Bej AK. Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. **Biotechniques, 12**: 706-17, 1992.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. **Short protocols in Molecular Biology.** USA: John Wiley & Sons; 1995.

Bahlaqui MA, Baleux B & Troussellier M Dynamics of pollution indicator and pathogenic bacteria in high-rate oxidation wastewater treatment ponds. **Wat Res,** 31(3): 630-638, 1997.

Bauab TM, Fernandes M & Falcão DP. Marcadores de virulência em *Aeromonas* spp isoladas de materiais clínicos humanos e de água doce. **Rev Ciênc Farm, 22(1)**: 131-145, 2001.

Bauab TM. ***Aermonas* spp de origem humana e ambiental: características fenotípicas, sorotípicas, genotípicas e de virulência.** Rio Claro – SP. 2000 [Tese de doutorado. Instituto de Biociências de Rio Claro – Universidade Estadual Paulista].

Belland RJ & Trust TJ. DNA/DNA reassociation analysis of *Aeromonas salmonicida*. **J Gen Microbiol, 134**(2): 307-15, 1988.

Birnboim HC & Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acid Res, 7**(6): 1513, 1979.

Borrel N, Figueras MJ & Guarro J. Phenotypic identification of *Aeromonas* genmospecies from clinical and environmental sources. **Can J Microbiol, 44:**103-108, 1998.

Boussaid A, Baleux B, Hassani L, Lesne J. *Aeromonas* species in stabilization pond in the arid region of Marrakesh, Marroco and relation to fecal pollution and climatic factors. **Microbiol Ecol, 21**: 11-20, 1991.

Brandi G, Siste M, Giardini F, Schiavano GF, Albano A. Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas* spp in different types of water. **Lett Appl Microbiol, 29**: 211-15, 1999.

Brandi G, Siste M, Schiavano GF, Salvaggio L & Albano A. Survival of *Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. **J Appl Bacteriol, 81**: 439-444, 1996.

Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker S. **Biology of microorganisms.** Prentice Hall, Inc. A Paramount Communication Company, Englewood Cliffs, New Jersey, 7ª ed., pp.1-286, 1994.

Brown LR, Sanderson K, Kirov SM. Plasmids and *Aeromonas* virulence. **FEMS Im Med Microbiol, 17**: 217-23, 1997.

Buchrieser C, Gangar VV, Murphee RL, Tamplin ML, Kaspar CW. Multiple *Vibrio vulnificus* strains in oyster as demonstrated by clamped homogenous electric field gel electrophoresis. **Appl Environ Microbiol, 61**: 1163-8,1995.

Bulhões CCC & Rossi Júnior OD. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arq Bra Med Vet Zootec** 54, (3) Belo Horizonte, 2002.

Cailleaux U, Dupont MJ, Hory B, Amsallem D & Michel-briand Y. Why did infection with *A. hydrophila* occur when water contains so many other microorganisms? **Clin Infect Dis, 16**(1): 174, 1993.

Carnahan AM & Joseph SW. *Aeromonas* update: new species and global distribution. **Experientia, 47**: 402-3, 1991.

Carnahan AM, Behram S & Joseph SW. Aerokey II: A Flexible Key for Identifying Clinical *Aeromonas* Species. **J Clin Microbiol, 29**(12): 2843-49, 1991a.

Carnahan AM, Chakraborty T, Fanning GR, Verma D, Ali A, Janda JM & Joseph SW. *Aeromonas trota* sp. nov., an Ampicillin – Susceptible Species Isolated from Clinical Specimens. **J Clin Microbiol, 29**(6): 1206-10, 1991b.

Carnahan AM, Fanning GR & Joseph SW. *Aeromonas jandaeii* (Formerly Genospecies DNA Group 9 *A. sobria*), a New Sucrose- Negative Species Isolated from Clinical Specimens. **J Clin Microbiol, 29**(3): 560-4, 1991c.

Carnahan AM, Maril MA, Fanning GR, Pass MA & Joseph SW. Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections. **J Clin Microbiol, 27**(8): 1826-30, 1989.

Carson J, Wagner T, Wilson T & Donachie L. Miniaturized tests for computer-assisted identification of motile *Aeromonas* species with an improved probability matrix. **J Appl Microbiol, 90**: 190-200, 2001.

Cavallo RA, Rizzi C, Vozza T, Stabili L. Viable heterotrophic bacteria in water and sediment in 'Mar Piccolo'of Taranto (Ionian Sea, Italy). **J Appl Microbiol, 86**: 906-16, 1999.

CETESB a, Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. 2000/ CETESB – São Paulo, 2001 – vol 1.

CETESB b, Resultados dos parâmetros e indicadores de qualidade das águas. 2000/ CETESB – São Paulo, 2001 – vol 2.

Chouret C, Volk C, Creason R, Jacosh J, Robinson J e Warnes C. Detection of *Aeromonas hydrophila* in drinking water distribution system: a field and pilot study. **Can J Microbiol, 47**: 782-6, 2001.

Clark NM, Chenoweth CE. *Aeromonas* infection of the Hepatobiliary system: Report of 15 cases and review of the literature. **CID, 37**: 506-13, 2003.

Colwell RR, Macdonell MT & De Ley J.Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. Nov. **Intern J System Bacteriol, 36** (3): 473-7, 1986.

Daily OP, Joseph SW, Coolbaugh JC, Walker RI, Merrel BR, Rollins DM, Seidler RJ, Colwell RR & Lissner CR. Association of *Aeromonas sobria* with human infection. **J Clin Microbiol, 13**(4): 769-777, 1981

Darbre PD. **Inroduction to practical molecular biology.** A Willey-Interscience Publication, 1ª ed., 1989.

Davis PJ & Stirling AJ. *Aeromonas hydrophila* wound infection associated with water immersion: an unusual football injury. **Injury, 24**(9): 633-4, 1993.

Delbeke E, Demarcq C, Roubin C & Baleux B. Contamination aquatique de plaies par *Aeromonas sobria* aprés bain de reviere. **Pres Med, 14**: 1292, 1985.

Deodhar LP, Saraswathi K & Varudkar A. *Aeromonas* sp and their association with human diarrheal disease. **J Clin Microbiol, 29**(5): 853-6, 1991.

Esteve C, Gutiérrez MC & Ventosa A. *Aeromonas encheleia* sp. nov., Isolated from European Eels. **Intern J System Bacteriol, 45**(3): 462-6, 1995.

Esteve C, Valera L, Gutierrez C & Ventosa A. Taxonomic study of sucrose-positive *Aeromonas jandaei*-like isolates from faeces, water and eels: emendation of *A. jandaeii* Carnahan *et al.* 1992. **Int J Syst Evol Microbiol, 53**: 1411-1419, 2003.

Falcão DP, Lustri W R & Bauab TM. Incidence of non- 01 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas spp.* in Fresh Water in Araraquara, Brazil. **Curr Microbiol, 37**(1): 28-31, 1998.

Fernandez MC, Giampaolo BN, Ibañez SB, Guagliardo MV, Esnaola MM, Conca L, Valdivia P, Stagnaro SM, Ciale C, Frade H. *Aeromonas hydrophila* and its relation with drinking water indicators of microbiological quality in Argentine. **Genetica, 108**: 35-40, 2000.

Garcia M, Sanroman AL, Gisbert JP, Argila CM & Moreira VF. *A. sobria* spontaneus bacterial peritonitis. **Am J Gastroenterol, 87**(12): 1890, 1992.

Garcia-Gimeno RM, Sanchez-Pozo MD, Amaro-López MA, Zurera-Cosano G. Behaviour of *Aeromonas hydrophila* in vegetable salads stored under modified atmosphere at 4 and 15 °C. **Food Microbiol, 13**: 369-74, 1996.

Gavriel AA, Landre JPB & Lamb AJ. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in northeast scotland. **J Appl Microbiol, 84**: 383-392, 1998.

Germano PML & Germano MIS. A água: um problema de segurança nacional. **Rev Hig Alim, 15**: 15-18, 2001.

Gibotti A, Saridakis HO, Pelayo JS, Tagliari KC & Falcão DP. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1, *Aeromonas* spp and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). **J Appl Microbiol, 89**:70-75, 2000.

Giles JS, Hariharan H, Heaney SB. The plasmid profiles of fish pathogenic isolates of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, and *Vibrio ordalli* from the Atlantic and Pacific coasts of Canada. **Can J Microbiol, 41**: 209-16, 1995.

Gluskin I, Batash D, Shoseyov D, Mor A, Kazar R, Azizi E & Boldur I. A 15 year study of the role of *Aeromonas spp* in gastroenteritis in hospitalized children. **J Med Microbiol, 37**: 315-8, 1992.

Gonzalez PR, Escolano C, Rodriguez JC, Sillero C & Royo G. *A. sobria* spontaneus bacterial peritonite and bacteremia. **Am J Gastroenterol, 89**(2): 290-1, 1994.

Gosling PJ, Turnbull PCB, Lightfoot NF, Pether JVS & Lewis RJ. Isolation and purification of *Aeromonas sobria* cytotonic enterotoxin and β–hemolysin. **J Med Microbiol, 38**: 227-34, 1993.

Grassi MA, Civera T & Turi RM. Isolation of cytotoxic *Aeromonas* spp. from food. **Vet Res Commun, 27**: 305-306, 2003.

Grey PA & Kirov SM. Adherence to Hep-2 cells and enteropathogenic potential of *Aeromonas spp.* **Epidemiol Infect, 110**: 279-87, 1993.

Hanninen ML, Ridell J, Hiverlä-Koski V. Phenotypic and molecular characteristics of *Aeromonas salmonicida* subsp, *salmonicida* isolated in Southern and Northern Finland. **J Appl Bacteriol, 79**: 12-21, 1995.

Harf-Monteil C, Le Flèche A, Riegel P, Prévost G, Bermond D, Grimont PAD & Monteil H. *Aeromonas simiae* sp. nov. isolated from monkey faeces. **Int J Syst Evol Microbiol, 54**: 481-485, 2004a.

Harf-Monteil C, Présvot G & Monteil H. Facteurs de virulence d'*Aeromonas caviae* isoles de cás cliniques. **Path Biol, 52**: 21-25, 2004b.

Hassani L, Imziln B, Boussaid A & Gauthier MJ. Seasonal incidence and antibiotic resistance among *Aeromonas* species isolated from domestic wastewater before and after treatment in stabilization ponds. **Microb Ecol 23:** 227-237, 1992.

Havelaar AH, Schets FM, Silfhout AV, Jansen WH, Wieten G & Kooiji DVD. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. **J Appl Bacteriol, 72**: 435-44, 1992.

Havelaar AH, Versteegh JPM & During M. The Presence of *Aeromonas* in Drinking Water Supplies in the Netherlands. **Zbl Hyg, 190**: 236-56, 1990.

Hickman-Brenner FW, Fanning GR, Arduino MJ, Brenner DJ & Farmer III JJ. *Aeromonas schubertii*, a New Manitol- Negative Species Found in Human Clinical Specimens. **J Clin Microbiol, 26**(8): 1561-4, 1988.

Hickman-Brenner FW, Macdonald KL, Steigerwalt AG, Fanning GR, Brenner DJ & Farmer III JJ. *A. veronii* a new ornithine descarboxilase positive species that may cause diarrhea. **J Clin Microbiol, 25**(5): 900-6, 1987.

Hirotani H, Sese C & Kagawa H. Correlations of *Aeromonas hydrophila* with indicators bacteria of water quality and environmental factors in a mountain stream. **Wat Environ Res,** 71(2):132-138, 1999.

Ho ASY, Sohel I & Schoolnik GK. Cloning and characterization of fxp, the flexible pilin gene of *Aeromonas hydrophila*. **Mol Microbiol, 6**: 2725, 1992.

Hokama A & Inagawa M. Purification and characterization of *Aeromonas sobria* pili, a possible colonization factor. **Infect Immun, 59:** 3478, 1991.

Holmes P, Niccolls LM & Sartory DP. The Ecology of Mesophilic *Aeromonas* in the Aquatic Environment. In: **The genus *Aeromonas*.** Edited by Austin B, Altwegg M, Gosling, PJ & Joseph S. England, p.127-50, 1996.

Houston CW, Chopra AK, Rose JM & Kurosky A. Review of *Aeromonas* enterotoxins. **Experientia, 47**: 424-9, 1991.

Husslein V, Bergbauer H & Chakraborty T. Studies on aerolysin and a serine protease from *Aeromonas trota* sp. nov. **Experientia, 47**: 420-1, 1991.

Huys G, Kämpfer P, Albert MJ, Kühn I, Denys R & Swings J. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended descripition of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 (Approved Lists 1980).**Int J Syst Evol Microbiol, 52**: 705-712, 2002.

Huys G, Kämpfer P, Altwegg M, Kersters I, Lamb A, Coopman R, Lüthy-Hottenstein J, Vancanneyt M, Janssen P & Kersters K. *Aeromonas popoffii* sp. nov., a Mesophilic Bacterium Isolated from Drinking Water Production Plants and Reservoirs. **Intern J System Bacteriol, 47**(4): 1165-71, 1997.

Huys G, Kersters I, Vancanneyt M, Coopmam R, Janssen P & Kersters K. Diversity of *Aeromonas* spp In Flemish Drinking Water Production Plants as

Determined by gas- liquid Chromatographic Analysis of Cellular Fatty Acid Methyl Esters (FAMEs). **J Clin Microbiol, 78**: 445-55, 1995.

Itoh H, Kuwata G, Tateyama S, Yamashita K, Inoue T, Kataoka H, Ido A, Ogata K, Takasaki M, Inoue S, Tsubouchi H & Koono M. *Aeromonas sobria* infection with severe soft tissue damage and segmental necrotizing gastroenteritis in a patient with alcoholic liver cirrhosis. **Pathol Intern, 49**: 541-546, 1999.

Ivanova EP, Matté GR, Matté MH, Coenye T, Huq A & Colwell RR. Characterization of *Pseudoalteromonas citrea* and *P. nigrifaciens* isolated from Different Ecological Habitats Based on Rep-PCR Genomic Fingerprints. **System Appl Microbiol25**: 275-283, 2002.

Ivanova EP, Romanenko LA, Chun J, Matté MH, Matté GR, Mikhailov V, Svetashev VI, Huq A, Maugel T, Colwell RR. Idiomarina gen. nov., comprising novel indigenous deeo-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol, 2**: 901-7, 2000.

Ivanova EP, Romanenko LA, Matté MH, Matté GR, Lysenko AM, Simidu U, Kita-Tsukamoto K, Sawabe T, Vysotskii MV, Frolova GM, Mikhailov V, Christen R, Colwell RR. Retrieval os the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and emendation of descripition. **Intern J Syst Evol Microbiol, 51**: 1071-8, 2001.

Ivanova EP, Zhukova NV, Gorshkova NM & Chaikina EL. Characterization of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from drinking water reservoir. **J Appl Microbiol, 90**: 919-927, 2001.

Janda JM & Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clin Infect Dis, 27**: 332-44, 1998.

Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Kellogg GH & Shimada T. Further studies on biochemical charactheristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. **J Clin Microbiol, 34**: 1930-1933, 1996.

Janda JM. Recente advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndrome associated with the genus *Aeromonas*. **Clin Microbiol Review, 4**: 397-410, 1991.

Joseph SW & Carnahan AM. The Isolation, Identification, and Systematics of the Motile *Aeromonas* species. **Ann Rev Fish Dis, 4**: 315-43, 1994.

Joseph SW, Carnahan A, Rollins D, Walker RI. *Aeromonas* and *Plesiomonas* in the environment: value of differential biotyping of Aeromonads. **J Diarr Dis Res. 6** (2): 80-87, 1988.

Joseph SW, Carnahan AM, Brayton PR, Fanning GR, Almazan R, Drabick C, Trudo EW & Colwell RR. *A. jandaei* and *A. veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. **J Clin Microbiol 29**(3): 565-9, 1991.

Joseph SW, Carnahan AM. Update on the Genus *Aeromonas*. **ASM News, 66** (6): 218-21, 2000.

Kerters I, Huys G, Van duffel H, Vacanneyt M, Kersters K, Verstraete W. Survival potencial of *Aeromonas hydrophila* in fresh waters and nutrient-poor water in comparison with other bacteria. **J Appl Bacteriol, 80**: 266-76, 1996.

Khardori N & Fainstein V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. **Ann Ver Microbiol, 42**:395-419, 1988.

Kirov SM. The public health significance of *Aeromonas spp* in foods. **Int J Food Microbiol,20**: 179-98, 1993.

Kohashi T, Sakai H, Marumo F & Sato C. *Aeromonas sobria* infection with severe muscle degenaration in patient with alcoholic liver cirrhosis. **AJG, 90** (12): 2234-2235, 1995.

Kokka RP, Lindquist D, Abbott SL & Janda JM. Structural and pathogenic properties of *Aeromonas schubertii*. **Infect Imm, 60**(5): 2075-82, 1992.

Kueh CSW, Kutarski P & Brunton M. Contaminated Marine Wounds – the risk of acquiring acute bacterial infection from marine recreational beaches. **J Appl Bacteriol, 73**:412-20, 1992.

Kuhn I, Albert MJ, Anzaruzzaman M, Bhniyan NA, Alabi AS, Islam MS, Neogi PKB, Huys G, Janssen P, Kerters K & Mollby R. Caracterization of *Aeromonas* spp isolated from humans with diarrhea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. **J Clin Microbiol,** Feb, 369-373, 1997.

Lederberg J, Lederberg WE. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **J Bacteriol, 63**(3): 399-406,1952.

Loewy AG, Santer UV, Wieczorek M, Blodgett JK, Jones SW & Cheronis JC. Purification and characterization of a novel zinc proteinase from cultures of *A. hydrophila*. **J Biol Chemistry, 268**(12): 9071-8, 1993.

Maalej S, Mahjoubi S, Elazri C, Dukan S. Simultaneous effects of environmental factors on motile *Aeromonas* dynamics in an urban effluent na in the natural water. **Wat Res, 37**: 2865-74, 2003.

MacMahon MAS & Wilson IG. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **Int J Food Microbiol, 70**: 155-162, 2001.

Martinez-Murcia AJ, Esteve C, Garay E & Collins MD. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a New Mesophilic Member of the Genus *Aeromonas*. **FEMS Immunol Med Microbiol, 91**: 199-206, 1992.

Martins LM, Marquez RF & Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunol Med Microbiol,32**: 237-242, 2002.

Massa S, Altieri C & D'Angela A. The occurrence of *Aeromonas* spp in natural mineral water and well water. **Internl J Food Microbiol, 63**:169-173, 2001.

Mateos D, Anguita J, Naharro G, Paniagua C. Influence of grouth temperature on the production of extra cellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. **J Appl Bacteriol, 74**: 111-8, 1993.

Mateos D, Anguita J, Rivero O, Naharro G & Paniagua C. Comparative study of virulence and virulence factors of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from water and sediments of a river. **Zbl Hyg, 193**: 114-22, 1992.

Matté GR. **Estudo de *Vibrio* spp potencialmente patogênicos através de métodos moleculares.** São Paulo; 2003 [Tese de Livre – Docência – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Matté MH, Nitrini SMOO, Matte GV. Aeromonas relacionadas com infecções no homem: Aspectos Epidemiológicos, Ecológicos, Laboratoriais, de Virulência e Relatórios à Saúde Pública. **Laes e Haes**. Pg. 62-74, 1996.

Matté MH. **Pesquisa de *Aeromonas spp.* Potencialmente Patogênicas em Alguns Pontos da Represa Guarapiranga Destinados à Recreação e Captação para Abastecimento Público.** São Paulo; 1995 [Tese de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Matté MH. **Ribotipagem de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas jandaei*, potencialmente patogências, isoladas de amostras de água do reservatório de Guarapiranga, são Paulo**. São Paulo, 1996. [Tese de Doutorado–Faculdade de Saúde Pública da USP].

McKeon DM, Calabrese JP & Bissonnettes GK. Antibiotic resistant Gram-negative bacteria in rural groundwater supplies. **Wat Res, 29**(8): 1902-1908, 1995.

McMahon MAS & Wilson IG. The occurrence of enteric pathogens na *Aeromonas* species in organic vegetables. **Intern J Food Microbiol,70**: 155-162, 2001.

Merino S, Camprubi S & Tomás JM. Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. **Infect Immun, 60**: 4343, 1992.

Merino S, Rubires X, Knochel S & Tomás JM. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **Int J Food Microbiol, 28**: 157, 1995.

Messi P, Guerrieri E & Bondi M. Survival of na *Aeromonas hydrophila* in an artificial mineral water microcosm. **Water Research,36**:3410-3415, 2002.

Miñana-Galbis D, Farfán M, Fusté MC & Lorén JG. *Aeromonas molluscorum* sp. nov. isolatede from bivalve molluscs . **J Appl Microbiol,** 2004.

Miñana-Galbis D, Farfán M, Lorén JG & Fusté MC. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. **J Appl Micobiol, 93**: 420-430, 2002.

Minnaganti RV, Patel PJ, Iancu D, Schoch PE & Cunha AB. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila*. **Heart & Lung, 29**(4): 306-308, 2000.

Miranda CD & Castillo G. Resistence to Antibiotic and Heavy Metals of Motile Aeromonads from Chilean Freshwater. **Scienc Total Environ, 224**: 167-76, 1998.

Monfort P & Baleux B. Dynamics of *A. hydrophila*, *A. sobria*, and *A. caviae* in a seawage treatment pond. **Appl Environ Microbiol, 56**(7): 1999- 2006, 1990.

Monfort P & Baleux B. Haemolysin occurrence among *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* strains isolated from different aquatic ecosystems. **Res Microbiol, 142**: 95-102, 1991.

Morena ML, Van R, Singh K, Brian M, Murray BE & Pickering LK. Diarrhea associated with *Aeromonas* species in children in day care centers. **J Infect Dis, 168**: 215-8, 1993.

Morgan J, Rodees G & Pickup RW. Survival of Nonculturable Aeromonas salmonicida in Lake Water. **Appl Environ Microbiol, 59**(3): 874-80, 1993.

Morgan JAW, Cranweel PA & Pickup RW. Survival of *Aeromonas salmonicida* in Lake Water. **Appl Environ Microbiol, 57**(6): 1777-82, 1991.

Morita K, Watanabe N, Kurata S & Kanamori M. β– lactam resistance of motile *Aeromonas* isolates from clinical and environmental sources. **Antimicrob Agents Chemother, 38**(2): 353-5, 1994.

Nayduch D, Honko A, Noblet GP & Stutzenberger F. Detection of *Aeromonas caviae* in the commom housefly *Musca domestica* by culture and polymerase chain reaction. **Epidemiol Infect, 127**: 561-566, 2001.

Neves MS, Nunes MP, Milhomem AM & Ricciardi ID. Production of enterotoxin and cytotoxin by *A. veronii.* **Brazilian J Med Biol Res, 23**: 437-40, 1990.

Newton JA & Kennedy CA. Wound infection due to *Aeromonas sobria.* **Clin Infect Dis, 17**: 1082-3, 1993.

Overman TL & Janda M. Antimicrobial susceptibility patterns of *Aeromonas jandaeii*, *A. schubertii*, *A. trota* and *A. veronii* biotype *veronii.* **J Clin Microbiol, 37**(3): 706-708, 1999.

Palumbo AS, Maxino F, Willian SAC, Buchanan RL, Thayer DW. Starch-Ampicilin Agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila.* **Appl Environ Microbiol, 50**(4): 1027-30, 1985.

Palumbo S, Abeya C & Stelma G. *Aeromonas hydrophila* group. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of food.** Ed. Vanderzant C and Splittstoesser F. pp. 497-515. Washington: APHA.

Persing DH. **Diagnostic Molecular Microbiology – principles and applications.** American Society for Microbiology. Washington, D. C. 1993.

Pesquisa de nucleotídeos, para microrganismo específico, no genbank. Disponível em: URL htpp//: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez

Pesquisa de referências bibliográficas no banco de dados da medline. Disponível em: URL http://research.bmn.com/medline

Pesquisa sobre Biologia Molecular. Disponível em: URL http//:www.public.iastate.Edu/~pedro/rt-1html

Pidiyar V, Kaznowiski A, Narayan NB, Patole M & Schouche YS. *Aeromonas* culicicola sp. Nov., from the midgut of *Culex* quinquefasciatus. **Int J Syst Evol Microbiol,** 52: 1723-1728, 2002.

Popoff M. Genus III: *Aeromonas* in: Murray RGE, Brenner DJ, Bryant MT, Holt JG, Krieg NR, Moulder JW, Pfnnig N, Sneath PHA & Staley JT. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Baltimore/ London, Willians & Wilkins, 1984, 1ª ed. V.1,p.545-8.

Radu S, Ahmad N, Ling FH & Reezal A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **Intern J Food Microbiol, 81**: 261-266, 2003.

Rall VLM, Iaria ST, Heidtmann S, Pimenta FC, Gamba RC & Pedroso DMM. *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatystoma* sp): virulence factors an drug susceptibility. **Rev Microbiol, 29:** 1998.

Rautelin H, Hänninen ML, Sivonen A, Turunen U & Valtonen V. Chronic Diarrhea due to a Single Strain of *Aeromonas caviae*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 14**: 51-3, 1995.

Razzolini MTP. **Pesquisa de *Aeromonas* e suas toxinas em águas de consumo humano provenientes de caixa d' água e bebedouros.** São Paulo – SP. 1998. [Dissertação de Mestrado. Universidade Mackenzie].

Rivera IG, Chowdhury MAR, Huq A, Jacobs D, Martins MT, Colwell RR. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and Nom-O1 strains. **World J Microbiol Biotechn,61**: 2898-2904, 1995.

Rivera ING & Martins MT. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. **Rev Cienc Farm, 17**: 115-136, 1996.

Rocha SM. **Estudo da ocorrência de gênero *Aeormonas* em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no município de Lins – SP. São Paulo – SP**. 2004 [Tese de doutorado. Faculdade de Saúde Pública – USP].

Rolston KVI, Zanduliet SE, Rodriguez S, Neuyen HT & Bodey GP. Spectrum of *Aeromonas* and *Plesiomonas* infections in patients with cancer and AIDS. **Experientia, 47**: 437-9, 1991.

Rossi Júnior OD, Nader Filho A, Amaral LA & Schocken-Iturrino RP. Isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas* da superfície das mãos de manipuladores de carne bovina, em matadouro-frigorífico do Estado de São Paulo. **Rev Hig Alim, 14**: 90-94, 2000.

Sandaa RA, Enger O. Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistence. **Appl Environ Microbiol, 60**(12): 4234-8, 1994.

Schofield GM. Emerging food-born pathogens and their significance in chilled foods. **J Appl Bacteriol, 72**: 267-273, 1992.

Schubert RH & Hegazi M. *Aeromonas eucrenophila* species nova. *Aeromonas caviae* a Later and Illgilimata Synonym of *Aeromonas punctata*. **Zbl Backt Hyg, 268**: 34-9, 1988.

Sechi LA, Deriu A, Falchi MP, Fadda G & Zanetti S. Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. **J Appl Microbiol, 92**: 221-227, 2002.

Seidler RJ, Allen DA, Lockman H, Colwell RR, Joseph SW, Daily OP. Isolation, enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. **Appl Environ Microbiol, 39**(5): 1010-8, 1980.

Shao J, Liu J & Xiang L. *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes un vitro. Available on line at www.sciencedirect.com, 2004.

Singh DV & Sanyal SC. Production of haemolysis and its correlation with enterotoxicity in *Aeromonas spp.* **J Med Microbiol, 37**: 267, 1992.

Singh DV, Dubey RS, Sanyal SC. Adherence of haemagglutinating na non haemagglutinating clinical and environmental isolates of *Aeromonas*. **J Diarrhoeal Dis Res, 11**(3): 157-60, 1993.

Singh DV, Sanyal SC. Haemagglutinating activity, serum sensitivity and enterotoxigenicity of *Aeromonas* spp. **J Med Microbiol, 38:** 49-53, 1993.

Software disponível na Internet para pesquisa de primers específicos. Disponível em: URL htpp//: www.alces.med.umn.edu/rawprimer.html

Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Murcia-Martinez AJ & Guarro J. Potencial virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freswater and seawater. **FEMS Immunol Med Microbiol,32**: 243-247, 2002.

Szabo EA, Scurrah KJ, Burrows JM. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Let Appl Microbiol, 30**: 456-60, 2000.

Urriza MG, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P & Quentin C. Impact of na Urban Efluent on Antibiotic Resistence of Riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Appl Environ Microbiol, 46**:125-132, 2000a.

Urriza MG, Pineau L, Capdepuy M, Roques C, Caumette P & Quentin C. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp isolated from two European rivers. **J Antimicrobial Chem, 46**:297-301, 2000b.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. United States Environmental Protection Agency proposes amendments to the Unregulated

Vadivelu J, Puthucheary SD, Phipps M & Chee YW. Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. **J Med Microbiol, 42**: 171-4, 1995.

Valera L & Esteve C. Phenotypic study by numerical taxonomy of strains belonging to the genus *Aeromonas*. **J Appl Microbiol, 93**: 77-95, 2002.

Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ & Gascon J. *Aeromonas* spp and Traveler's Diarrhea: Clinical Features and Antimicrobial Resistance. **Emerging Infectious Diseases.** Vol.9, nº 5, pp. 552-555, 2003.

Vivekanandhan G, Savithamani K, Hatha AAM & Lakshmanaperumalsamy P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **Int J Food Microbiol, 76**: 165-168, 2002.

9. ANEXOS

A.1. Meios de Cultura

A.1.1. Água Peptonada Alcalina 1% (APA 1%)

Peptona	1%
Cloreto de sódio	1%
Água destilada	100 mL
pH 8,6	

A.1.2. Ágar Amido Ampicilina (AA)

Triptona	0,5%
Peptona bacteriológica	0,5%
Cloreto de sódio	0,5%
Amido	1%
Ágar bacteriológico	1,5%
Vermelho de fenol 0,2%	0,17 mL
Ampicilina 500 mg/ mL	10 μL
Água destilada	100 mL

A.1.3. Ágar MacConkey (MC)

Meio preparado de acordo com as especificações do fabricante.

A.1.4. Ágar Sangue Ampicilina (AS)

Base Müeller-Hinton preparado de acordo com as instruções do fabricante.

Sangue de carneiro desfibrinado	5%
Ampicilina 500 mg/ mL	10 μL

A.1.5. Ágar Ferro de Kligler

Preparado de acordo com as instruções do fabricante.

A.1.6. Caldo Lúria

Bacto triptona	1,0%
Extrato de levedo microbiológico	0,4%
Cloreto de sódio	1,0%
Água destilada	100 mL
pH 6,8	

A.1.7. Citocromo-Oxidase

Reativo para oxidase	0,001g
Água destilada	1 mL

A.1.8. Glicerol 80%

Glicerina	60 mL
Água destilada	40 mL

A.1.9. Reativo de Indol

P-dimetilaminobenzaldeído	1%
Álcool absoluto	50 mL
Ácido ortofosfórico	20 mL
Água destilada q.s.p.	100 mL

A.1.10. Solução Salina 0,85%

Cloreto de sódio	0,85%
Água destilada	100 mL

A.2. Meios para a Série Bioquímica

A.2.1. APA 0%

Peptona	1%
Água destilada	100 mL
pH 8,6	

A.2.2. APA 6%

Peptona	1%
Cloreto de sódio	6%
Água destilada	100 mL
pH 8,6	

A.2.3. APA 8%

Peptona	1%
Cloreto de sódio	8%
Água destilada	100 mL
pH 8,6	

A.2.4. APA 10%

Peptona	1%
Cloreto de sódio	10%
Água destilada	100 mL
pH 8,6	

A.2.5. Base Purple Broth 1%

Base	1%
Cloreto de sódio	1%
Água destilada	100 mL
pH 6,8	

A.2.6. Manitol

Base purple broth	100 mL
Manitol	1%
pH 6,8	

A.2.7. Manose

Base purple broth	100 mL
Manose	1%
pH 6,8	

A.2.8. Sacarose

Base purple broth	100 mL
Sacarose	1%
pH 6,8	

A.2.9. Arabinose

Base purple broth	100 mL
Arabinose	1%
pH 6,8	

A.2.10. Salicina

Base purple broth	100 mL
Salicina	1%
pH 6,8	

A.2.11. Base Moeller (Descarboxilase sem Aminoácido)

Base	1%
Cloreto de Sódio	1%
Água destilada	100 mL
pH 6,8	

A.2.13. Lisina

Base Moeller	100 mL
Lisina	1%
pH 6,8	

A.2.14. Ornitina

Base Moeller	100 mL
Ornitina	1%
pH 6,8	

A.2.15. *Arginina*

Peptona	0,1g
Fosfato de potássio	*0,03g*
Ágar bacteriológico	0,3g
Cloreto de sódio	1g
Arginina	1g
Solução Vermelho de fenol a 0,2%	0,5 mL
Água destilada	100 mL
pH 6,8	

A.2.16. Hidrólise da Esculina

Ágar BHA (Brain-Heart Agar)	5,2%
Cloreto de sódio	1%
Esculina	1%
Cloreto férrico ($FeCl_3$)	0,05%
Água destilada	100 mL

A.3. Reagentes para Extração de Plasmídios

A.3.1. Solução I (solução de lise)

Lisozima	4 mg/ mL
Glicose	2%
EDTA	10 mM
Solução de Tris-HCl (pH=8,0)	25 mM

A.3.2. Solução II

Hidróxido de sódio 2 N	20%
SDS	10%
Água Milli Q	100 mL

A.3.3. Solução III

Solução de acetato de sódio	3 M

pH 4,8 (*acertado com ácido acético glacial*)

A.3.4. Solução IV

Solução de acetato de sódio	100 mM
Solução de Tris-HCl (pH=8,0)	50 mM

A.3.5. TE II (Tampão Tris- EDTA)

Solução de Tris-HCl (pH=8,0)	10 mM
EDTA (pH=8,0)	0,1 mM

A.4. Reagentes para Eletroforese

A.4.1. Gel de Agarose

Agarose NA	1,2%
TAE 1X	100 mL

A.4.2. Brometo de Etídio

Brometo de etídio	5%
Água destilada	100mL

A.4.3. TAE (Tampão Tris- Acetato- EDTA)

Solução 50X (estoque):

Tris – base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA (pH= 8,0)	100 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Solução de uso 1X:

TAE 50X	20 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A.4.4. Tampão Corante 6X

Azul de bromofenol	0,25%
Glicerina	30%