

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA**

Estudo da ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no Município de Lins –SP.

SOLANGE MARTONE ROCHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública

**Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública
Orientadora: Maria Helena Matté**

**São Paulo
2004**

Estudo da ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no Município de Lins –SP.

SOLANGE MARTONE ROCHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública

**Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública
Orientadora: Maria Helena Matté**

**São Paulo
2004**

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Tese, por processos fotocopiadores

Assinatura:

Data:

Aeromonas

*Sou discreta, mas difícil.
Gosto do frio e calor
Nos peixes posso morar
E no homem dor eu causar.*

Dália dos Prazeres Rodrigues e
Roseli Vígio Ribeiro

UM DIA VOCÊ APRENDE...

William Shakespeare

...EU APRENDI, QUASE TUDO

Dedico esta Tese

À Deus, sem ele nada disso estaria acontecendo...

À minha mãe e amiga, Ana, pela compreensão, companheira de sempre em todos os sentidos...

Ao meu pai Antônio, pelo apoio e presença...

Ao meu tio Aristides sempre me orientando em todos os sentidos da melhor forma possível...

Agradecimentos

À Deus, por ter permitido cruzar mais esta jornada, me dando saúde e força emocional para superar as vicissitudes durante todo este período.

À minha mãe, meu pai, minha sobrinha Thatiana, minha sobrinha neta Pietra por todo carinho e apoio que me proporcionaram.

Ao Tio Aristides por sempre estar pronto a me ouvir, pela amizade e caminhos que se abriram.

À minha orientadora Professora Dra. Maria Helena Matté pela orientação segura, imparcial, pela paciência, incentivo, para excussão deste trabalho, abrindo novas perspectivas em minha carreira. E, também foi durante o período deste trabalho que acabei ganhando uma amiga irmã.

Aos filhos de minha orientadora, Elisa e Guilherme que fizeram indiretamente parte desta tese, que quando necessário permaneciam até altas horas da noite na Universidade, sem demonstrar qualquer resistência.

Ao Professor Dr. Glavur Rogério Matté pelo apoio e auxílio prestado desde do início deste trabalho.

Ao professor Dr. Roque Passos Piveli pela aceitação de minha participação no Programa PROSAB – CNPq-FINEP e permissão do uso de amostras colhidas em Lins. E, nessas viagens, embora as discussões fossem intermináveis, passei a entender e respeitar a opinião particular de cada profissional.

À Professora Titular Helena Ribeiro (Chefe do Departamento de Saúde Ambiental) e a Professora Titular Frida Marina Fischer (Vice-Chefe), pela permissão de dedicar-me, quase exclusivamente a esta tese.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública, pela colaboração e convivência amigável, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Prática de Saúde Pública por todo auxílio dado durante a realização desta tese.

Aos Funcionários da Biblioteca, em particular para Gisele, pelo auxílio e procura incansável de artigos.

Aos Funcionários da Pós-Graduação e Aprimoramento, que sempre me auxiliaram com presteza.

Aos amigos

À amiga Cristina Elizabeth Marques pela amizade e apoio que perdura 27 anos.

À amiga de sempre Maria do Carmo de Oliveira Dória, pelo apoio incondicional e amizade desde do início.

À Silvana Audrá Cutolo pela atenção dada durante este trabalho e minha carreira.

À Mariza Pereira pelo carinho e amizade.

A Francisca Alzira dos Santos Pertenella, pela realização das análises de Coliformes Totais e E. coli.

À Maria Elisa Frigo e Beutel sempre me apoiando em todos os sentidos.

À Odila e Elba da Diretoria da Faculdade de Saúde Pública, pelo apoio, presteza e bate papos durante o intervalo para o café.

Às amigas e colegas do Laboratório de Saúde Pública: Agnes, Ana Maria, Fernanda (Fefe), Karla (Ursa), Luciana (Loló), Maria Tereza, Márcia, Marta, Mirian, Rita, Suzete, Suzi, Tiago, Vandrea, Vera, Viraneide (Vivi).

Em especial:

À Andrea Cabral (Déa) por me ensinar desde como se faz um meio de cultura...pela amizade...até as longas conversas no camarote no Continente Antártico.

À Marisa Morita (Ma), pela ajuda na execução das análises, amiga... sempre pronta a escutar as intermináveis horas de desabafos (e como), durante a volta para casa no trânsito infernal de São Paulo, sem reclamar, procurando me orientar da melhor forma possível, até dando uns puxões de orelha, rss!!.

À Milena Dropa (Mi) que jamais recusou esforços para que tudo pudesse ser realizado no laboratório durante a fase experimental, e também sempre pronta a me ouvir e me dando força a continuar.

À Therezinha Travassos (There) pelo apoio e a amizade que conquistamos neste período.

À todos os amigos e colegas Antárticos que de uma forma indireta fizeram parte desta tese, entre eles: Luís Antônio (Laps) e Rosane (Ro).

Em especial

À Cristiane Gallego Augusto em que tivemos a oportunidade de nos conhecer no Treinamento Pré-Antártico (TPA) no Rio de Janeiro, continuando no Continente Gelado, e que até hoje perdura o que conquistamos...nossa amizade.

Ao Professor Dr. Vicente Gomes do Instituto Oceanográfico da USP em que tivemos a benção de Deus de nos conhecer no Continente Antártico em que ganhei um amigo.

Agradeço também

À SABESP – Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo.

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 James, pelo auxílio durante as coletas em Lins.

RESUMO

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

Introdução: Organismos pertencentes ao gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídos no ambiente aquático sendo atualmente considerados como patógenos emergentes. Estudos demonstraram que, estes podem produzir uma série de fatores de virulência, e ainda um maior número de casos clínicos vêm sendo confirmados e atribuídos às diferentes espécies de *Aeromonas*. **Objetivo:** Estudar a ocorrência do gênero *Aeromonas* em efluentes de um sistema de lagoas de estabilização e discutir o significado da presença destes para a saúde pública. **Métodos:** A determinação de *Aeromonas* spp foi realizada pela técnica de tubos múltiplos (NMP/100 mL). Para a verificação da presença e ausência (PA) as colônias foram isoladas em ágar sangue ampicilina, ágar amido ampicilina e ágar MacConkey. As colônias que apresentaram resultados presuntivos para o grupo *Aeromonas* foram submetidas ao reisolamento em Ágar Amido, e a provas bioquímicas para identificação das espécies. O perfil plasmidial foi realizado de acordo com a metodologia descrita por BIRNBOIN & DOLLY 1979. **Resultados:** *Aeromonas* spp foram isoladas em 72,4% e 55,1% das amostras provenientes da entrada e saída da lagoa anaeróbia respectivamente, e em 48,3% da saída da lagoa facultativa variando as contagens entre <3 e $3,0 \times 10^9$ NMP/100mL. Na unidade de desinfecção por cloro entre <3 e $9,0 \times 10^5$ NMP/mL **Conclusões:** Observou-se que embora haja uma tendência de decaimento nas contagens de *Aeromonas*, não é possível eliminá-las do sistema estudado, mesmo após cloração. Esses organismos podem representar um risco à saúde devido à seleção de cepas resistentes que são lançadas no meio ambiente.

Descritores: *Aeromonas*, Lagoas de Estabilização, Reúso, Plasmídios, Desinfecção com Cloro, Esgoto, Saúde Pública.

SUMMARY

Rocha SM. **The occurrence of the genus *Aeromonas* in wastewater treatment systems by stabilization ponds in the City of Lins, SP.** São Paulo. 2004 [PhD Thesis – School of Public Health, University of São Paulo].

Introduction: Organisms of the genus *Aeromonas* are widely distributed in the aquatic environment, being now considered emerging organisms. Studies show that these organisms can produce a series of virulence factors, and that a major number of clinic cases have been confirmed and attributed to the different species of *Aeromonas*. **Objective:** Study the occurrence of the genus *Aeromonas* in effluents of a stabilization ponds system and discuss the meaning of the presence of these organisms for public health. **Methods:** *Aeromonas* spp determination was carried out by the most probable number technique (NMP/100mL). To verify the presence or absence, the colonies were isolated in ampicilin blood agar, starch agar, and Mc Conkey agar. Colonies showing presumptive results for *Aeromonas* group were re isolated in starch agar and to biochemical tests to identify the specie. The plasmidial profile was carried out according to the methodology described by BIRNBOIN & DOLLY 1979. **Results:** *Aeromonas* spp were isolated in 72,4% and 55.1% of the samples from the affluent and the end of anaerobic lagoons, respectively, in 48.3% of the effluent of the facultative lagoon in counts that varied from <3 and 3.0×10^9 NMP/100mL. In the disinfection unit counts varied from <3 and 9.0×10^5 NMP/100mL. **Conclusions:** It was possible to observe that even though a tendency of decaiment was noted for the counts of *Aeromonas*, it was not possible to totally eliminate this organisms from the studied system, even after the chlorination. These organisms could pose a health risk due to the selection of resistant strains released in the environment.

Descriptors: *Aeromonas*, stabilization ponds, reuse, plasmids, chlorine disinfection, sewage and Public Health.

INDICE

	Pág
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1 Taxonomia	9
2.2 Ocorrência	12
2.2.1 Ocorrência em sistemas de tratamento de esgotos	13
2.2.2 Ocorrência em sistemas de abastecimento de água	15
2.2.3 Ocorrência em águas naturais	17
2.2.4 Ocorrência em alimentos	20
2.3 Fatores de Virulência e Resistência	22
2.4 Patogenia	26
2.5 Perfil Plasmidial	30
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo Geral	33
4.2 Objetivos Específicos	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Caracterização do Sistema de Tratamento dos Esgotos	34
5.2 Amostras e Amostragem	38

5.3 Determinação das Variáveis Abióticas	39
5.4 Pesquisa de <i>Aeromonas</i> spp	40
5.4.1 Procedimento de Campo	41
5.4.2 Presença ou Ausência (PA)	41
5.4.3 Determinação do Número Mais Provável de <i>Aeromonas</i> spp	43
5.4.4 Enriquecimento da amostra	43
5.4.5 Isolamento das colônias	45
5.5 Provas Bioquímicas	45
5.6 Perfil Plasmidial das cepas de <i>Aeromonas</i> isoladas	48
5.6.1 Extração de Plasmídios	48
5.6.2 Eletroforese em gel de agarose	49
5.7 Análise dos Dados	50
6. RESULTADOS	52
6.1 Ocorrência de <i>Aeromonas</i>	52
6.2 Dinâmica de remoção de <i>Aeromonas</i> no sistema	56
6.3 Dinâmica de remoção de <i>Aeromonas</i> spp e <i>Escherichia coli</i> no sistema	57
6.4 Variáveis abióticas	59
6.5 Análise do Perfil Plasmidial do gênero <i>Aeromonas</i>	60
7. DISCUSSÃO	64

7.1 Presença de <i>Aeromonas</i>	65
7.2 Espécies de <i>Aeromonas</i> observadas no sistema	69
7.3 <i>Aeromonas</i> e <i>Escherichia coli</i>	71
7.4 <i>Aeromonas</i> e variáveis abióticas	74
7.5 <i>Aeromonas</i> e sistema de desinfecção com cloro	76
7.6 Estudo do perfil plasmidial	81
7.7 Aspectos do reúso de águas residuárias	84
8. CONCLUSÕES	87
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
10. REFERÊNCIAS	89

GLOSSÁRIO

ANEXOS

Anexo I – Meios de Cultura e Reagentes utilizados para determinação de *Aeromonas* spp

Anexo II – Reagentes para extração de plasmídios

Anexo III A - Resultados da Temperatura da água e pH ao longo do sistema de lagoa de estabilização e da unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio, 2001/2002, Lins – SP.

Anexo III - B: Parâmetros Físicos-Químicos ao longo do sistema de lagoas de estabilização e da unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio,

2001/2002, Lins – SP.

Anexo III - C: Doses e Tempo de contato empregados no Sistema de Cloração – Julho de 2001 a Novembro de 2002

Anexo III - D: Datas das coletas e locais de amostragem realizadas no período de estudo, 2001/2002, Lins – SP.

Anexo III - E: Densidade de Coliformes Totais e *E. coli* (NMP/100 mL) em amostras ao longo do sistema de lagoas de estabilização e na unidade desinfecção por hipoclorito de sódio, 2001/2001, Lins – SP.

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1: Casos clínicos e as espécies de <i>Aeromonas</i> identificadas segundo autor, ano de ocorrência e parâmetros médico-laboratoriais, período de 1995 a 2004.	28
Quadro 2: Características bioquímicas esperadas para as diferentes espécies de <i>Aeromonas</i> .	47

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Presença e ausência de <i>Aeromonas</i> spp ao longo do sistema de lagoas de estabilização e na unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio no período de julho de 2001 a novembro de 2002 – Lins – SP.	53
Tabela 2: Número mais provável de <i>Aeromonas</i> spp em amostras correspondentes aos diferentes pontos de amostragem do sistema de lagoas de estabilização no período de julho de 2001 a março de 2002 – Lins –SP.	54
Tabela 3: Número mais provável de <i>Aeromonas</i> spp em amostras dos ensaios, submetidos à desinfecção com hipoclorito de sódio no período de julho de 2001 a março de 2002 – Lins – SP	54
Tabela 4: Espécies de <i>Aeromonas</i> , número e porcentagem, observados segundo a etapa do sistema de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização e na unidade de desinfecção, Lins-SP, 2001-2002.	56
Tabela 5: Distribuição das cepas de diferentes espécies de <i>Aeromonas</i> , provenientes do tanque de desinfecção por cloro, segundo o número de plasmídios observados – São Paulo – 2001/2002	62

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Esquema do processo de tratamento de esgotos utilizado na cidade de Lins – SP mediante sistema de lagoas de estabilização	35
Figura 2: Sistema de tratamento de esgotos sanitários utilizados no município de Lins – SP e unidade de desinfecção	36
Figura 3: Vista parcial da Lagoa Anaeróbia	37
Figura 4: Vista panorâmica da Lagoa Facultativa	37
Figura 5: Unidade piloto utilizada para o tratamento por hipoclorito de sódio do efluente de lagoa de estabilização	38
Figura 6: – Esquema representativo do procedimento utilizado para a pesquisa de organismos do gênero <i>Aeromonas</i> em amostras provenientes de efluentes das diferentes etapas do sistema de lagoas de estabilização e da unidade de desinfecção.	42
Figura 7: Esquema representativo do procedimento da técnica dos tubos múltiplos para a determinação do número mais provável de organismos do gênero <i>Aeromonas</i> em amostras provenientes de efluentes das diferentes etapas do sistema de lagoas de estabilização e da unidade de desinfecção.	44
Figura 8: Dinâmica das concentrações de <i>Aeromonas</i> e <i>E. coli</i> nos diferentes pontos de amostragem do sistema de lagoas de estabilização e do sistema de desinfecção.	58
Figura 9: Perfil plasmidial de cepas de <i>Aeromonas</i> isoladas de amostras	61

do tanque de desinfecção por cloro utilizando metodologia de Birnboim & Doly, 1979.

Figura 10: Número de plasmídios, e porcentagem das cepas de 61 *Aeromonas* isoladas do tanque de desinfecção por cloro.

1. INTRODUÇÃO

Em todos os continentes, entre as maiores preocupações com o bem estar e, saúde das populações, nas últimas décadas, está a necessidade de dispor de água em quantidade e qualidade suficientes para suprir as exigências vitais de cada indivíduo. Porém, as perspectivas quanto à disponibilidade de água no planeta não parecem animadoras.

O Fórum Mundial da Água ocorrido em março de 2003 e o relatório do “World Water Development Report”, coordenado pela UNESCO, com a participação de 23 agências da ONU, corroboram essa situação.

BORN (1991) afirma *“independentemente de se considerar a água como um recurso escasso ou infinitamente renovável, é preciso lembrar a sua demanda crescente, função não só do crescimento populacional, mas também, e especialmente, das diversas atividades sócio-econômicas que os agrupamentos humanos realizam”*.

Nesse sentido, convém lembrar que, dos recursos hídricos existentes no Planeta, cerca de 97% estão no ambiente marinho, oceanos e mares; 2,5% correspondem à água doce, sendo que desses, 2% estão em geleiras, e apenas 0,5% disponíveis nos corpos d’água da superfície, isto é, em rios e lagos, sendo que a maior parte desta, ou seja, 95%, encontra-se no subsolo (SHIKLOMANOV 1998). Se for considerado o tipo de demanda em nível mundial, chega-se à seguinte distribuição: 65%

das águas são destinadas à irrigação, 25% às atividades industriais e cerca de 10% para uso doméstico e de recreação (MANCUSO 2003).

Dentre os processos de tratamento de esgotos sanitários, as lagoas de estabilização constituem um procedimento destinado a minimizar a concentração de matéria orgânica nos cursos d'água, visando assim, a recuperação e a manutenção da qualidade ecológica e sanitária. Este tipo de tratamento, na verdade, reproduz a dinâmica de atuação dos microrganismos que ocorrem naturalmente no meio hídrico (rios, lagos etc.).

Este clássico sistema de tratamento que fundamentalmente utiliza a energia da luz solar, é ainda operado pela Companhia de Saneamento Básico de São Paulo – SABESP, que gerencia 195 sistemas de lagoas de estabilização para o tratamento de esgotos sanitários (RAZZOLINI 2003).

Entretanto, as águas residuárias provenientes destes tipos de tratamento, podem representar risco ao meio ambiente e à saúde pública. De qualquer modo, a reutilização dessas águas é de grande valia, devido a grande escassez de águas para a utilização em usos múltiplos. Faz-se necessário portanto que exista um planejamento quanto à redução de lançamento de contaminantes e matéria orgânica nos corpos d'água o que resultará na redução da poluição hídrica. Nesse sentido, e como enfatiza RAZZOLINI (2003), haverá a diminuição dos custos de tratamento de águas residuárias; economia de energia; aproveitamento de elementos nutritivos presentes no efluente, especialmente para uso na irrigação

agrícola e jardins ornamentais; e uma maior regularização da vazão de água disponível.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reunindo especialistas na área sanitária e em especial do reúso de águas já indicava na década de 70 do século XX, a utilização de métodos de tratamento capazes de atender os critérios estabelecidos para o aproveitamento das águas residuárias para diversos usos, entre eles a irrigação, como também determinava diretrizes sanitárias sobre o uso de águas residuárias na agricultura e aqüicultura (WHO, 1971).

Em relação à possibilidade do uso agrícola, as normas sobre a qualidade das águas de reúso, destinadas à irrigação de culturas sem restrições (incluindo verduras e legumes consumidos crus) exigem a determinação do número máximo das bactérias do grupo coliforme, e requisitos mínimos de tratamento e redução do número de ovos de helmintos (OMS 1989).

O conceito de reúso de águas residuárias na agricultura apresentou algumas mudanças ao longo dos anos, como menciona BAHRI (1999); entre elas destacam-se: o desenvolvimento de programas de controle destinados à proteção da água, bem como a necessidade de adotar metodologias destinadas ao estabelecimento de padrões referentes aos limites químicos e microbiológicos.

Vários pesquisadores ressaltam a importância do controle microbiológico e parasitológico em águas residuárias empregadas na agricultura, com o objetivo de evitar a ocorrência de agravos, tanto na

população consumidora, quanto nos agricultores diminuindo ao máximo os riscos à saúde das populações expostas (OMS 1989).

Ainda sobre esse aspecto, CROOK & SURAMPALLI (1996) assinalam a importância e necessidade de estudos para desenvolver critérios de reuso, principalmente direcionados à proteção à saúde. Mas são esses mesmos autores que apontam não haver, nos Estados Unidos, uma regulamentação federal, indicando que somente alguns estados apresentam normas e critérios próprios, e quando isto não ocorre utilizam as normas da Environmental Protection Agency – EPA, publicadas em 1992. Enfatizam, também que os Estados da Califórnia e do Arizona exigem o tratamento terciário e a desinfecção visando obter um produto final livre de organismos patogênicos. Esta obrigatoriedade se dá principalmente quando há o risco ou a possibilidade de existir o contato direto com a água de reúso.

KATZENELSON e colaboradores, em 1976 alertavam sobre o risco de infecções associadas à irrigação na agricultura com esgotos domésticos. Na pesquisa, constataram que a incidência de shigeloses, salmoneloses e hepatites eram duas a quatro vezes maiores em comunidades que utilizavam com águas residuais de esgotos na irrigação. Esses mesmos autores já recomendavam a desinfecção do efluente, no intuito de se alcançar uma qualidade sanitária satisfatória.

HESPANHOL (2003), ao comentar as normas e critérios existentes no Estado da Califórnia, USA literalmente assim se manifesta: “a evidência epidemiológica demonstra que a mera presença de organismos patogênicos em esgotos, solos e culturas não significa, deterministicamente,

a transmissão de doenças. As barreiras protetoras, providenciadas por fatores característicos dos microrganismos (dose efetiva, persistência, carga residual, latência etc.), dos hospedeiros (imunidade natural ou adquirida, idade e sexo, condições gerais de saúde) e outros fatores associados à educação sanitária e padrões de higiene pessoal, fazem com que o risco real de provocar doenças seja, geralmente, muito inferior ao risco potencial, caracterizado pela mera constatação da presença de organismos patogênicos”.

Porém, esse mesmo autor alerta sobre o fato de que normas e regulamentos de outros países não deveriam ser admitidos ou simplesmente copiados de modo aleatório e indiscriminado, pois podem não vir a atingir os mesmos objetivos quanto à proteção da saúde da população, em virtude da possibilidade da ocorrência de diferenças relacionadas a condições locais, bem como da variabilidade das espécies.

No caso do reúso de águas residuárias, a aplicação do princípio da precaução é um recurso que pode auxiliar na tomada de decisões, quando a situação atual do conhecimento, não permite prever o efetivo risco para a saúde da população, advindos da utilização dessas águas (GOLDSTEIN 2001, DALLARI & VENTURA 2002).

Ressalta-se, portanto, a necessidade de um maior investimento em ciência e tecnologia em face da existência de situações de risco potencial desconhecido, em que há a necessidade de se buscar soluções que permitam agir com maior segurança implicando na transformação do risco potencial em risco conhecido.

Desde que as ponderações anteriores sejam efetuadas quanto à necessidade da preservação e proteção ambiental para a manutenção da saúde, é possível entender o quanto é preciso realizar estudos e pesquisas sobre o reúso de águas residuárias, bem como conhecer sua relação com outros indicadores microbiológicos. Além dos classicamente utilizados em tratamentos de esgotos: bactérias do grupo coliforme, helmintos e parâmetros físicos e químicos, faz-se necessária, a pesquisa de outros microrganismos emergentes.

Nesse sentido, o presente estudo, fez parte do PROSAB* – Programa de Pesquisa em Saneamento Básico – Edital 3 – Tema 2, e foi intitulado “Desinfecção de Esgotos Tratados em Lagoas de Estabilização e Reúso em Fertirrigação, Piscicultura e Hidroponia”.

Participaram do mesmo as seguintes entidades: a Faculdade de Saúde Pública (Departamentos de Saúde Ambiental e de Prática de Saúde Pública), Escola de Engenharia de São Carlos-EESC (Departamento de Hidráulica e Saneamento) e Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ todos da Universidade de São Paulo, juntamente com a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo-SABESP (Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico).

O objetivo do programa foi o de verificar a qualidade sanitária de esgotos sanitários tratados por sistemas de lagoa de estabilização, visando seu emprego na irrigação de culturas agrícolas.

* PROSAB – Programa de Pesquisa de Rede de Saneamento Básico, financiado pela FINEP/CNPq/Caixa Econômica Federal.

Os organismos do gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídos no ambiente aquático e são reconhecidos por produzir doença em diferentes espécies animais. Atualmente, o interesse nesse patógeno, responsável por gastroenterites, bacteremia, e septicemia no homem, vem aumentando significativamente, uma vez que sua presença nas diferentes fontes de água para o consumo humano pode representar um risco a saúde (MATTÉ 1995; RAZZOLINI 1998; GAVRIEL *et al.* 1998; JOSEPH & CARNAHAN 2000).

A propósito, VILLARI *et al.* (2003) citam que em muitos países como Holanda, Canadá e Itália foram introduzidos métodos analíticos para verificação da presença de *Aeromonas* spp nas águas destinadas ao abastecimento público. Enquanto que, na Itália, limites provisórios foram estabelecidos, em 1997, para água mineral bruta (10 UFC/100 mL) e depois de engarrafadas (100 UFC/100 mL). Estes índices foram utilizados até o final de 1998.

PAVLOV *et al.* (2003) discorrem sobre os riscos de infecção por *Aeromonas* spp e *Pseudomonas* spp e afirmam que o elevado número de patógenos oportunistas, justifica a necessidade de uma reavaliação nas normas de qualidade de águas na África do Sul, como também mais estudos detalhados sobre o potencial risco à saúde.

Como enfatizado, e considerando a importância da pesquisa da qualidade sanitária de águas residuárias para utilização em culturas e ainda devido à escassez de informações a respeito dos aspectos sanitários dessas águas no Brasil, julgou-se relevante pesquisar os

organismos do gênero *Aeromonas* spp em sistemas de tratamento por lagoas de estabilização. Esses organismos são considerados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Environmental Protection Agency (EPA - Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana) como patógenos emergentes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Taxonomia

O gênero *Aeromonas* tem sido caracterizado como um grupo de taxonomia complexa. De acordo com a 7ª edição do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, pertencia à família *Pseudomonadaceae*; em seguida, na 8ª edição foi classificado como pertencente à família *Vibrionaceae* e, COWELL *et al.* 1986 propôs a família *Aeromonadaceae* disponível no “Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera Berge’s Manual of Systematic Bacteriology” (GARRIT *et al.* 2001).

Devido às semelhanças fenotípicas entre as espécies de *Aeromonas*, e ainda devido à diversidade desses organismos, sua identificação ao nível de espécie pode representar um processo exaustivo e complicado. Por essa razão, pesquisadores estão associando métodos moleculares às técnicas bioquímicas (DORSCH *et al.* 1994; JANDA e ABBOTT 1996; KAZNOWSKI 1998).

O gênero *Aeromonas* inicialmente compreendia três espécies, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*. Entretanto, com base na existência de amostras com características bioquímicas atípicas, e em estudos de biologia molecular, alguns autores propuseram a inclusão de novas espécies para cepas que não apresentavam semelhança, de grupo genético, às cepas com as quais eram semelhantes fenotipicamente (MATTÉ 1995).

O gênero aqui estudado refere-se a bactérias que se apresentam como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, produtores das enzimas catalase e oxidase, fermentadores de glicose e de outros carboidratos e geralmente móveis por flagelos polares. Crescem na ausência de cloreto de sódio (NaCl), em temperatura mínima de 0°C a 5°C e máxima de 38°C a 41°C. Os valores de pH para crescimento oscilam entre 5,5 a 9,0. Algumas cepas hemolíticas quando cultivadas em ágar sangue; são resistentes ao agente vibriostático O129 (2,4 diamino-6,7-di-isopropil timina) e, em sua maioria, produtoras de citotoxinas, enterotoxinas, proteases, endotoxinas, adesinas, proteinases e quitinase (ALTWEGG & GEISS 1999).

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.

JANDA & DUFFLEY (1988) propuseram a diferenciação do gênero em cinco espécies *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. media*, já JOSEPH *et al.* (1991) consideraram quatro espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* agrupando *A. sobria*, e acrescentando a espécie *A. jandaei*.

Aeromonas schubertii foi denominada por HICKMAN-BRENNER *et al.* (1988), a partir de uma amostra isolada de material clínico, que não fermentou o manitol.

MARTINEZ-MURCIA *et al.* (1992), propuseram a introdução de uma nova espécie ao gênero, *A. allosaccharophila*, para uma cepa de *Aeromonas*, com características atípicas, isolada de amostra de fezes diarréicas. Por sequenciamento de RNA apresentou-se diferente das outras espécies e fenotípicamente como característica a acidificação da arabinose variável e salicina e acetoina (Voges-Proskauer) negativos.

PAVAN *et al.* (2000) isolaram no rio Matanza, situado em Buenos Aires - Argentina, considerado poluído, cepas de *Aeromonas* identificadas fenotipicamente e genotipicamente propuseram como *Aeromonas salmonicida*, mas, de acordo com suas propriedades fenotípicas uma nova sub-espécie *Aeromonas salmonicida pectinolytica*.

A flora bacteriana das espécies de mosquito *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* foi estudada por PIDIYAR *et al.* (2002). Baseados nos resultados da caracterização bioquímica e DNA-DNA de hibridização, os autores propuseram que as cepas do gênero *Aeromonas* isoladas representam uma nova espécie a qual denominaram de *Aeromonas culicicola*.

HUYS *et al.* (2003) isolaram nos órgãos internos de rãs (*Rana rugulosa*) com septicemia na Tailândia, cepas de *Aeromonas* que foram submetidas às técnicas de “Polimorfismo da amplificação de um fragmento” (Amplified fragment length polimorfism - AFLP), amplificação de seqüências repetitivas (ERIC-PCR) seqüenciamento do 16SrDNA, hibridização DNA/DNA e extensa caracterização fenotípica, concluindo que

poderia se tratar de uma nova sub-espécie de *Aeromonas hydrophila* que foi proposta como *A. hydrophila ranae*.

HARF-MONTEIL *et al.* (2004) isolaram das fezes de dois macacos saudáveis (*Macaca fascicularis*) cepas de *Aeromonas* identificadas pelo método hibridização DNA/DNA que foram propostas como uma nova espécie denominada *Aeromonas simiae*.

Dentre as espécies de *Aeromonas* constam 16 espécies a saber: *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. media*, *A. encheleia*, *A. allosaccharophila*, *A. eucrenophila*, *A. bestiarium*, *A. caviae*, *A. veronii*, biogrupo *sobria*, *A. veronii* biogrupo *veronii*, *A. schubertii*, *A. jandaei*, *A. trota*, *A. popoffii*, *A. culicicola* e *A. simiae* (ALLEN *et al.* 1983; POPOFF *et al.* 1984; HICKMAN-BRENNER *et al.* 1987; HICKMAN-BRENNER *et al.* 1988; SCHUBERT & HEGAZI 1988; CARNAHAN *et al.* 1991a; CARNAHAN *et al.* 1991b; 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.* 2004)

2.2 Ocorrência

As *Aeromonas* spp são microrganismos que possuem uma ampla distribuição em vários tipos de ambientes hídricos, podendo ser encontradas em água doce, salgada e salobra. Estes podem ou não ser poluídos, receber ou não tratamento de desinfecção pelo cloro, apresentar ou não contaminação por fezes, dispor de matéria orgânica e conter material

oriundo do solo (HAVELAAR *et al.* 1992; KIROV 1993 VALIVELU *et al.* 1995; BRANDI *et al.* 1996).

Esta grande distribuição deve-se à sua alta capacidade de multiplicação independentemente de haver algum hospedeiro humano ou animal, bem como à facilidade de sobrevivência em diversificados ambientes (KHARDORI & FAINSTEIN 1988). Condições adequadas de pH, temperatura e nutrientes (especialmente fósforo) favorecem a multiplicação dessas bactérias em ambientes aquáticos (RIPPEY & CABELLI 1980, 1985).

2.2.1 Ocorrência em sistemas de tratamento de esgotos

PARODI & PESO (1983) estudando a incidência do gênero *Aeromonas* nos efluentes da cidade de Buenos Aires na Argentina identificaram a presença de *A. hydrophila* e *A. sobria*, enfatizando a importância da determinação da frequência destas espécies nos efluentes, já que o destino final deste efluente é o Rio da Plata que abastece a cidade.

MONFORT & BALEUX (1990), avaliando a dinâmica espaço-temporal das *Aeromonas* spp e coliformes fecais no tratamento por lagoas de estabilização na cidade Mèze na França, com uma população de 7.500 habitantes. Sistema que apresenta 3 lagoas sucessivas com uma área de 8 hectares (1ª lagoa 4 hectares, 2ª e 3ª lagoas, 2 hectares cada), com profundidade média variando de 1,40 m a 1,20 m, com tempo de detenção de 70 dias no inverno e 40 dias no verão. Relataram que, do ponto de vista

sanitário, a presença de *Aeromonas* pode ser mais importante que a de coliformes fecais, os quais são somente indicadores de contaminação fecal.

Esses mesmos autores, no ano seguinte, verificando a distribuição espaço-temporal de *Aeromonas* spp e coliformes fecais, no Lago Thau (França), corpo receptor do esgoto tratado da cidade antes mencionada, levantam a hipótese de que *Aeromonas* spp possa ser menos sensível ao tratamento do que os coliformes fecais (MONFORT & BALEUX 1991).

BOUSSAID *et al.* (1991), também observaram que o gênero *Aeromonas* em lagoas de estabilização com período de detenção de 50 dias em Marrakesh, Marrocos mostrou-se significativamente mais resistente ao processo de tratamento, quando comparado com os coliformes fecais. Segundo os autores, esse comportamento pode estar relacionado à existência de biotipos de espécies adaptadas a uma ampla variedade de hábitos aquáticos, como exemplo, a maior sobrevivência de *A. sobria*, conhecida como patogênica, que seria suficiente para limitar o reúso dessas águas para a irrigação.

Avaliando a eficiência de outro sistema de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização, em Marrakesh, Marrocos HASSANI *et al.* (1992), o qual era composto por duas lagoas, sendo 13 dias de detenção na primeira e 9 dias na segunda, verificaram uma eficiência de remoção de *Aeromonas* spp, entre 98,8% a 97%.

BAHLAOUI *et al.* (1997), analisando a dinâmica de indicadores de poluição e bactérias patogênicas no mesmo sistema de

tratamento estudado por (MONFORT & BALEUX, 1991) seguida por uma lagoa de oxidação experimental, que consiste em duas lagoas com profundidade de 0,35 metros, cada, sendo que a primeira possui uma variação de 4 a 12 dias de retenção, enquanto a segunda apresenta 8 dias. Assinalaram que o gênero *Aeromonas* apresentou maior complexidade do que os coliformes fecais. 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 bactérias patogênicas estudadas, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas* spp.

Avaliando a eficiência de remoção quanto as espécies de *Aeromonas*, no sistema de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização em Marrocos, IMZILN et al. (1998), observaram que *Aeromonas sobria* foi relativamente menos efetiva na sua remoção quando comparada com *A. caviae*

Aeromonas sobria, isolada em lagoas de estabilização e uma lagoa de oxidação, também apresentou-se mais resistente do que *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *E. coli* como discorrem BENCHOKROUN et al. (2003).

2.2.2 Ocorrência em sistemas de abastecimento de água

Pesquisa realizada por BURKE et al. (1984), na Austrália, em um sistema de distribuição de água não clorada, encontraram *Aeromonas* em 34% das amostras analisadas, coliformes totais em 23% e *E.*

coli em 11%. Das *Aeromonas* isoladas 9,9% eram provenientes da captação, 57,1% do armazenamento e em 33% do sistema de distribuição. Ressaltam ainda que 61% das cepas eram enterotoxigênicas e 64% produtoras de hemolisina.

PAYMENT *et al.* (1988) analisaram o sistema de filtração e distribuição de água no Canadá, observaram que *A. hydrophila* e coliformes em água bruta apresentaram uma concentração de 74.000 e 21.000 UFC/L respectivamente, enquanto que na água tratada não foi observada a presença de *Aeromonas* spp, mas reapareceu no sistema de distribuição, alertando para possibilidade de seu isolamento, mesmo quando cultivos anteriores tenham sido negativos.

HAVELAAR *et al.* (1992), estudando cepas de *Aeromonas* de origem clínica, isoladas de pacientes com diarreia, 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.

KIROV 1993 relata que a principal fonte de infecção por *Aeromonas* é a água, ocorrendo em altas concentrações, mesmo em águas cloradas; cita que, na Austrália, o aumento dos níveis de *Aeromonas* spp na água tratada ($> 10^2/100$ mL) coincide com o aumento de sua incidência associada a gastroenterites nos meses de verão.

Estudo efetuado por RAZZOLINI (1998), em caixas d'água e bebedouros no município de São Paulo, demonstraram a presença

de *Aeromonas* spp nesses ambientes, sugerindo a necessidade do desenvolvimento de campanhas educativas quanto a importância da vigilância sanitária da qualidade da água.

GAVRIEL *et al.* (1998), examinando 31 sistemas de distribuição de água demonstraram claramente que estes organismos podem permanecer nos reservatórios com níveis de cloro de até 0,45 mg/L, e que fatores como temperatura e matéria orgânica na água têm uma importante influência no controle das *Aeromonas* spp.

2.2.3 Ocorrência em águas naturais

ARAÚJO *et al.* (1989) demonstraram a importância do gênero *Aeromonas* para a saúde pública quando realizaram estudo verificando a possível correlação entre a presença de *Aeromonas* spp e o número de coliformes fecais presentes em três ambientes de água doce. Essa pesquisa concluiu que *Aeromonas* spp apresentou uma relação com os organismos indicadores de poluição fecal, porém esta se deu em ambientes nos quais a matéria orgânica provinha de esgotos domésticos. Todavia, naqueles onde a matéria orgânica era proveniente de outras origens essa relação não foi detectada. O estudo assinala ainda que o uso exclusivo de bactérias indicadoras subestima o risco de infecção por patógenos como *Aeromonas* spp, considerando oportuno o controle dessa bactéria em estações de tratamento de água para abastecimento e águas recreacionais,

bem como para aquicultura, usos em que o risco direto de infecção é mais acentuado.

A distribuição de espécies de *Aeromonas* em águas com diferentes níveis de poluição foi observada por ARAÚJO *et al.* (1991) onde *A. caviae* predominou nas águas residuárias, enquanto águas com baixa concentração de poluição *A. sobria* teve um aumento considerável em relação às outras espécies.

PIANETTI *et al.* (1998) não observaram correlação entre a presença de *Salmonella*, *Campylobacter* e *Aeromonas* com a possível presença de indicadores fecais nos rios Metauro e Flogia na Itália.

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

A correlação entre *A. hydrophila* e bactérias indicadoras foi estudada por HIROTANI *et al.* (1999) no rio Ishite, Japão. 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 por atividade humana e sim por ser uma bactéria autóctone.

CAVALLO *et al.* (1999) analisando a viabilidade de bactérias heterotróficas, tanto na água como no sedimento no Mar Piccolo, na Itália, verificaram que *Aeromonas* spp foi dominante nesses ambientes.

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 relatam MASSA *et al.* (2001) que estudaram a presença desse microrganismo em água mineral e de poço. Os autores não encontraram nenhuma espécie na água mineral, mas, dos vinte poços analisados, em cinco foi detectada sua presença. Os mesmos autores relatam que o grupo *Aeromonas* pode ser considerado um bom indicador da qualidade sanitária da água de poço.

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

Mais recentemente, espécies de *Aeromonas* foram encontradas no Continente Antártico por MATTÉ *et al.* (2003) (pesquisa em andamento), onde a temperatura da água variou entre -1°C a 4°C , confirmando, assim, sua ampla distribuição e sua capacidade de sobreviver a ambientes extremos de temperatura.

Analisando a contaminação de produtos irrigados com água do rio Giovenco, na Itália, PIANETTI *et al.* (2004) verificaram que *Aeromonas caviae* apresentou maior frequência entre as espécies.

VALLY *et al.* (2004) notificaram que *Aeromonas hydrophila* provocou infecções de pele associadas com exposição a lama em pacientes que tinham participado de uma competição de “futebol de lama” na Austrália. Este campo havia sido irrigado com a água de um rio próximo durante um mês antes da competição.

2.2.4 Ocorrência em alimentos

Dois fatores parecem ter um significado importante para *Aeromonas* spp ser considerada como patógeno emergente segundo MERINO *et al.* (1995). O primeiro é a maior demanda por alimentos naturais (verduras e legumes) que necessitam de refrigeração. O segundo fator é que durante os meses quentes existe um aumento do consumo de água em alguns casos associados a uma maior incidência de gastroenterites.

GARCIA-GIMENO *et al.* (1996), avaliando o comportamento da *Aeromonas hydrophila* em vegetais concluíram que sua ocorrência varia de acordo com o tipo de verdura, e que seu crescimento nestes tipos de alimentos é dependente da temperatura.

A possibilidade de contaminação em alfaces por patógenos como *Listeria* spp, *Yersinia* spp, *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas caviae* foi investigada em três supermercados e uma fábrica de

saladas na Austrália por SZABO *et al.* (2000), os autores relatam o risco potencial deste produto.

Vegetais (alface e rúcola), queijo (ricota), salame, presunto cru e sorvetes foram avaliados por VILLARI *et al.* (2000), na Itália. Os autores puderam constatar uma alta porcentagem de *Aeromonas* spp nestes alimentos, e *Aeromonas hydrophila* foi mais comumente isolada em alimentos de origem animal, enquanto *Aeromonas caviae* foi a espécie dominante entre os vegetais.

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 por bactérias do gênero *Aeromonas*.

MCMAHON & WILSON (2001) investigaram a ocorrência de patógenos entéricos e espécies de *Aeromonas* em vegetais orgânicos. Os pesquisadores observaram que *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *E. coli* O:157 e *Listeria* não foram encontradas em nenhuma das amostras analisadas, enquanto foram isoladas nas amostras analisadas 34% de espécies de *Aeromonas*.

A. caviae foi isolada de mosca doméstica (*Musca domestica*) por NAYDUCH *et al.* (2001). Os autores analisaram o papel da mosca na transmissão e veiculação de patógenos, investigando a prevalência desta espécie na mosca doméstica, coletada em fazendas e em um restaurante da Carolina do Sul nos Estados Unidos. Detectaram *A.*

caviae em 78% das moscas provenientes de gado leiteiro e 39% do restaurante.

BULHÕES *et al.* (2002), investigando queijos minas frescal tipo artesanal, encontraram *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas schubertii*, sendo 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. Concluem que estes resultados devem servir de alerta aos serviços de saúde pública.

2.3 Fatores de Virulência e Resistência

Investigando a resistência a antibióticos entre espécies de *Aeromonas* do afluente e efluente em lagoas de estabilização em Marrakesh, Marrocos HASSANI *et al.* (1992) inferem que as diferentes espécies são afetadas diferentemente durante o tratamento (principalmente nos meses quentes) e que a temperatura é um fator importante no controle da distribuição de *Aeromonas* spp. Observaram que *Aeromonas sobria*, descrita como patogênica, mostrou-se relativamente mais resistente ao tratamento, podendo assim limitar o uso desse efluente para a irrigação. Concluem a investigação sugerindo mais estudos para esclarecer melhor a sobrevivência de *A. sobria* no esgoto e no solo.

Os dados de potencial de virulência para *Aeromonas* spp foram observados por ASHBOLT *et al.* (1995) que listam os mesmos, em ordem crescente: água salgada < esgoto bruto < efluente terciário < água doce.

MATTÉ 1995 comenta que, com a diferenciação de espécies de *Aeromonas*, vários pesquisadores vêm estudando fatores de virulência produzidos por cepas isoladas de amostras clínicas e ambientais, de forma isolada ou em conjunto, na tentativa de estabelecer a relação entre tipos de toxina e patogenicidade.

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.

KHASHE *et al.* (1996) caracterizando cepas de *Aeromonas hydrophila* de diferentes origens por meio de sorologia concluíram que o O:34 é um importante sorogrupo de *Aeromonas*, e que a maioria das cepas desta espécie apresentaram fatores de virulência.

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* spp pudessem 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.

Estudando o potencial de virulência de *A. caviae* em lagoas de estabilização em Marrocos, IMZILN *et al.* (1998), encontraram uma correlação significativa entre as cepas isoladas do esgoto tratado e fatores de virulência. Sugeriram que o sistema de lagoas de estabilização pode ter selecionado essa espécie patogênica.

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

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

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

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 consumida por animais.

BAUAB (2000), estudando marcadores de virulência em *Aeromonas* spp, em amostras clínicas e de água doce, concluiu que a citotoxina foi encontrada com maior frequência em cepas isoladas de infecções extra-intestinais e a enterotoxina foi mais comum em fezes diarréicas.

SCOGLIO *et al.* (2001) investigando *Vibrios* e *Aeromonas* em ostras, mexilhões e camarões verificaram que as cepas apresentaram um ou mais fatores de virulência. Esse fato foi considerado como risco à saúde devido ao consumo desses produtos. Mas, alertam que raramente são relatados, pois sua presença não tem sido suficientemente investigada.

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.

A produção de toxinas por cepas de *Aeromonas*, em amostras clínicas, apresentou uma maior porcentagem em relação à amostra de alimentos como relatam MARTINS *et al.* (2002).

VIVEKANANDHAN *et al.* (2002), analisando a resistência a antibióticos de *Aeromonas hydrophila*, isoladas em peixes e camarões no Sul da Índia, verificaram que a múltipla resistência a

antibióticos por essas cepas mostra que estes animais são uma fonte de alto-risco.

Estudo realizado com peixes da Malásia por RADU *et al.* (2003) verificou que algumas espécies de *Aeromonas* eram resistentes a antibióticos. Alertam, também, que apesar de na Malásia não tenha sido observada a ocorrência de infecções por *Aeromonas*, pois os peixes são geralmente ingeridos cozidos, há a possibilidade de infecção em países em que estes são ingeridos crus.

2.4 Patogenia

Ainda que *Aeromonas* spp esteja amplamente distribuída no ambiente, alguns investigadores questionam a associação de sua presença ao aumento da frequência de doenças diarréicas. JOSEPH e CARNAHAN 2000, entretanto entendem que esse fato é decorrente do grande número de casos não notificados.

Outro aspecto importante a ser observado sobre este grupo de bactérias, é o de ser considerado um patógeno emergente, o que talvez implique na quase inexistência de dados epidemiológicos. Há contudo relatos pontuais (Quadro 1) ou de alguns surtos descritos a seguir.

Avaliando 59 episódios de bacteremia devido a espécies de *Aeromonas* KO & CHANG (1994) notaram que *Aeromonas hydrophila* foi a espécie mais comum e, que, entre os casos estudados, dois pacientes

estavam em ocupações que envolviam contato freqüente com água e solo: o primeiro trabalhava em uma fazenda e o segundo com piscicultura.

Pesquisa sobre *Aeromonas* spp realizada por MATTÉ (1995) na Represa do Guarapiranga – SP, relata que o gênero *Aeromonas* tem sido responsabilizado como agente causal de doenças em diversas espécies animais (peixes, répteis, anfíbios) e por uma variedade de doenças no homem: diarreia autolimitante; formas severas similares à diarreia colérica; infecções de pele, ouvido, cirurgias, casos de necrose e septicemia, pacientes com cortes, perfurações, abrasões, e distúrbios imunológicos em indivíduos que tiveram prévia exposição a ambientes contaminados, principalmente com água, e alimentos. Concluiu que as cepas isoladas neste ambiente são capazes de produzir fatores de virulência, sendo esses organismos considerados um risco a saúde pública.

O Quadro 1, elaborado com base em levantamento bibliográfico, ilustra os registros dos últimos anos quanto ao gênero *Aeromonas* como agente causal de doenças no homem.

Quadro 1: Casos clínicos e as espécies de *Aeromonas* identificadas, segundo autor, ano de ocorrência e parâmetros médico-laboratoriais, período de 1995 a 2004.

Autor	Ano	Caso	Idade	Sexo	Origem da Infecção	Fatores Predisponentes	Material de Isolamento	Agente Isolado	Evolução
Kohashi T et al	1995	Necrose estomacal	56	M	NC	Cirrose alcóolica	NC	<i>Aeromonas sobria</i>	Morte
Tateyama S et al	1995	Necrose estomacal	82	F	NC	NC	NC	<i>Aeromonas sobria</i>	Morte
Martino R et al	1997	Necrose estomacal	50	M	NC	NC	NC	<i>Aeromonas sobria</i>	Morte
Funada H et al	1997	Pneumonia	50	F	NC	NC	NC	<i>Aeromonas sobria</i>	Morte
Funada H et al	1997	Pneumonia	49	M	NC	NC	NC	<i>Aeromonas sobria</i>	Morte
Tateyama S et al	1998	Necrose estomacal	52	M	NC	NC	NC	<i>Aeromonas sobria</i>	Morte
Itoh H et al	1999	Necrose estomacal	49	M	Sushi	Cirrose alcóolica	Fígado	<i>Aeromonas sobria</i>	Morte
Minnaganti RV et al	2000	Necrose Fascitis	85	M	NC	NC	NC	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Morte
Sarma SO et al	2002	Bacteremia	75	M	picada de cobra	Diabetes	Sangue	<i>Aeromonas jandaei</i>	Cura
Kamano Y et al	2003	Embolia pulmonar	68	M	Abcesso no fígado	NC	Sangue	<i>Aeromonas sobria</i>	Cura
Ouderkirk SP et al	2004	Meningite	40	M	Verme	NC	Via lombar	<i>Aeromonas sobria</i>	Cura
Cheng NC et al	2004	Necrose Fascitis	44	M	Hepatite	Síndrome de Marfan	Sangue	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Morte
Pinna A et al	2004	Infecção ocular	35	M	Água	NC	cultura córnea	<i>Aeromonas caviae</i>	Cura
Shiina Y et al	2004	gás intravascular	15	F	NC	bacteremia	órgãos/tecidos/sangue	<i>Aeromonas veronii sobria</i>	Morte

NC= Não consta da referência; M = masculino; F = feminino

MATTÉ *et al.* (1996), estudando *Aeromonas* spp relacionadas com infecções no homem, apresentaram várias recomendações, entre elas: pesquisar *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas em mananciais; relacionar o ambiente aquático com a possibilidade da presença dessa bactéria como agente causal; fornecimento de água tratada à população e também a adequada manutenção de alimentos, principalmente os que são ingeridos crus.

Como salientam GRANUM *et al.* (1998) o gênero *Aeromonas* pode tornar-se um sério problema de segurança alimentar, pois muitas espécies podem crescer sob refrigeração. Os mesmos autores discorrem que *Aeromonas hydrophila* pode ter causado enfermidades em indivíduos que ingeriram peixe cru, que continha 10^7 UFC/grama dessa espécie.

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

A água benta é considerada por EMERSON (2001) como uma fonte em potencial de infecção com várias bactérias coliformes e, incluindo *Aeromonas hydrophila*.

VILA *et al.* (2003) pesquisando *Aeromonas* spp como causa de diarreia dos viajantes relatam que *A. sobria* e *A. caviae* estavam mais freqüentemente associadas com essa enfermidade.

CLARK e CHENOWETH (2003) verificaram que espécies de *Aeromonas* são uma importante causa de infecções no sistema hepatobiliar e ocasionalmente no pancreático, e que para pacientes com problemas biliares ou que receberam transplantes são, em particular, um risco.

2.5 Perfil Plasmidial

Plasmídios são elementos extracromossômicos, formados por DNA circular, que se replicam de forma autônoma. Esses elementos podem codificar uma ampla variedade de determinantes genéticos, que permitirão que seu hospedeiro sobreviva melhor em um ambiente adverso ou mesmo possam competir com outros organismos que ocupem o mesmo nicho ecológico, embora estes não sejam essenciais para a sobrevivência da bactéria hospedeira (MATTÉ 1996).

Os plasmídios são especialmente importantes na rápida transferência de material genético na comunidade microbiana. Esgotos hospitalares, domésticos, corpos d'água doce e salgada, animais, plantas e solos, possuem bactérias capazes de transferir seus plasmídios por conjugação.

Dessa maneira, genes que codificam a produção de resistência a determinados antibióticos, podem ser transferidos entre uma variedade de espécies bacterianas e muitos gêneros (MATTÉ 1996).

A grande importância dos plasmídios conjugativos no ambiente é que se um pequeno número de bactérias portadoras desses

plasmídios é introduzido no ambiente com grande número de bactérias receptoras apropriadas, esse pode rapidamente converter toda população em doadora, gerando problemas no tratamento de doenças infecciosas.

MORENA *et al.* (1993) utilizaram o estudo do perfil plasmidial e eletroforese de campo pulsado (PFGE) com o propósito de relacionar e caracterizar cepas de *Aeromonas* isoladas de crianças com diarreia. Observaram um padrão de DNA idêntico para duas crianças envolvidas no surto em questão, enquanto as cepas restantes apresentavam diferentes padrões.

VADIVELU *et al.* (1995) sugerem que a presença de plasmídios em *Aeromonas hydrophila* pode oferecer mais informações sobre a presença de fatores de virulência.

MATTÉ 1996 não observou correlação entre a presença de plasmídios e a produção de fatores de virulência nas cepas de *Aeromonas* estudadas na Represa do Guarapiranga – SP, porém sugere que a expressão de fatores de virulência, em específico a produção de β -hemolisina e acúmulo de fluido em alça ligada, tenham sua codificação determinada em nível genômico. 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 em amostras ambientais e clínicas, verificaram que os plasmídios eram mais comumente encontrados no ambiente do que nas espécies clínicas.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando a crescente demanda de água e a escassez de informações a respeito dos aspectos sanitários envolvidos em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização e o reuso dessas águas para possível irrigação de culturas agrícolas, bem como a importância da investigação dos microrganismos patogênicos para a saúde pública, em particular destaque as do gênero *Aeromonas*, que têm sido foco de muitas pesquisas, nos mais diversos ambientes, justifica-se o presente estudo, como forma de auxiliar entidades de saúde pública e do meio ambiente na prevenção de eventuais agravos à saúde da população.

4. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a ocorrência do gênero *Aeromonas* em um sistema de lagoas de estabilização e na unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio e discutir o significado da presença desses organismos para a saúde pública.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a ocorrência de *Aeromonas* spp provenientes do sistema de lagoas de estabilização e da unidade de desinfecção;
- Identificar as espécies de *Aeromonas* isoladas;
- Verificar a correlação entre a presença de *Aeromonas* e bactérias indicadoras de contaminação fecal (coliforme total e *E. coli*), associado com as condições operacionais impostas e variáveis de natureza física-química;
- Pesquisar a ocorrência de plasmídios nas cepas de *Aeromonas* spp provenientes do sistema piloto de desinfecção por cloro.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Caracterização do sistema de tratamento dos esgotos

O presente estudo foi realizado no sistema de tratamento de esgotos sanitários por lagoas de estabilização, operado pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP no município de Lins – SP. A cidade de Lins está situada a 445 km da cidade de São Paulo, apresenta uma área de 571 km², e uma população de 65.952 habitantes (IBGE, 2000).

O sistema de tratamento dos esgotos sanitários oriundos da cidade de Lins é constituído por três conjuntos de lagoas em série: lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa, sendo o tempo de retenção total do sistema de 15,5 dias (cinco dias na lagoa anaeróbia e 10,5 dias na lagoa facultativa) (Figura 1). As dimensões das lagoas são de 4,1 de profundidade e volume útil de 23.227,03 m³ na lagoa anaeróbia, e 1,9 de profundidade e volume útil de 55.522,87 m³ na lagoa facultativa.

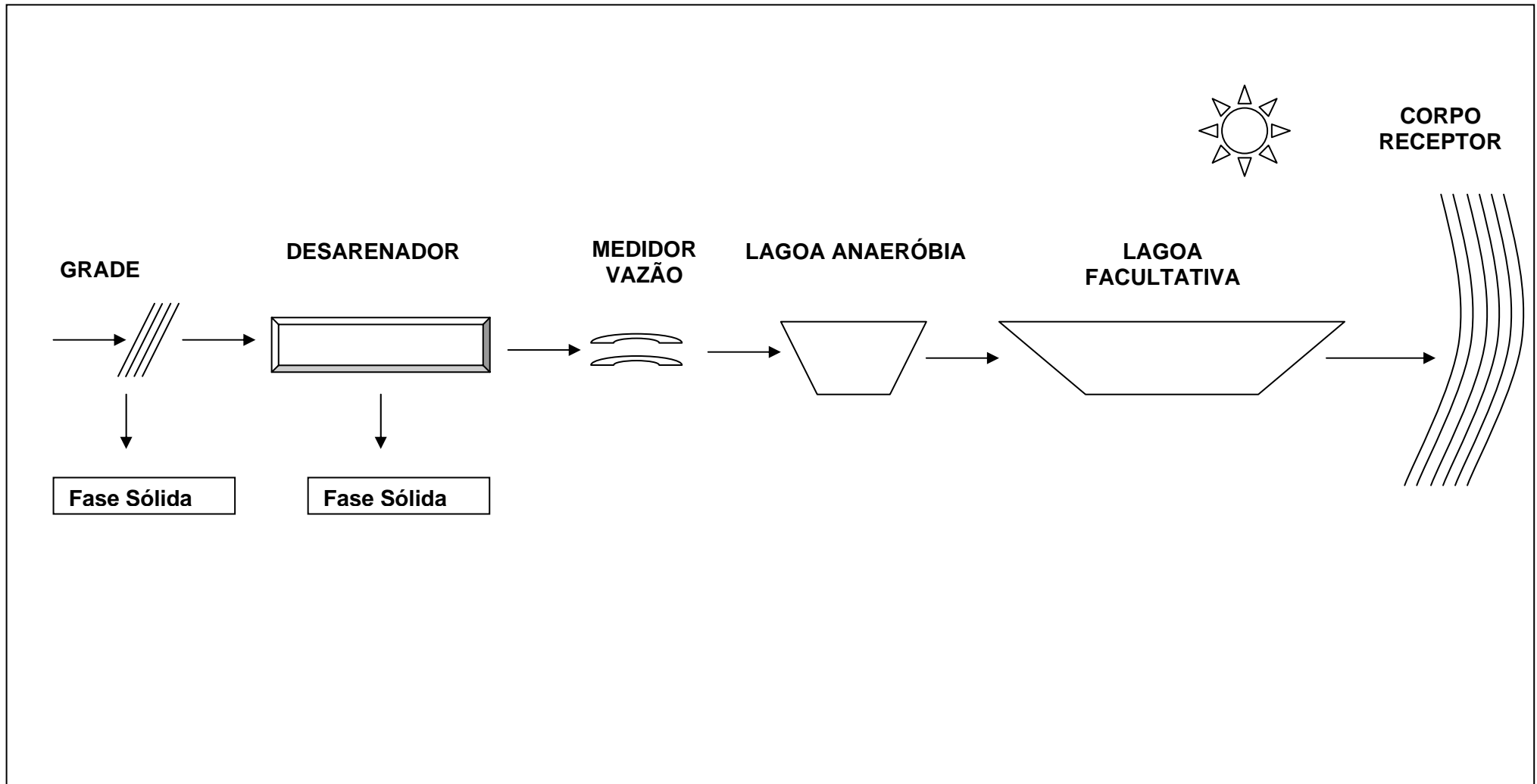


Figura 1: Esquema do processo de tratamento de esgotos utilizado na cidade de Lins – SP mediante sistema de lagoas de estabilização

O sistema de tratamento de esgotos sanitários de Lins por meio de lagoas de estabilização contou com uma instalação piloto para desinfecção de esgotos tratados por cloração. O processo de desinfecção por hipoclorito de sódio foi efetuado utilizando tanque de contato (Figura 2), o qual possui 4 m³ de volume e 1 de profundidade útil.

A solução de hipoclorito de sódio foi introduzida na tubulação cerca de cinco metros antes da entrada do tanque, por meio de dosador automático. A concentração do desinfetante e o tempo de contato aplicado não foram constantes, pois os ensaios de desinfecção, tinham por objetivo variar as concentrações e tempos de contato. Para uso na irrigação, a dose era constante, 10 mg/L e tempo de contato de 30 minutos. As doses e os tempos de contatos empregados estão no Anexo III-C.

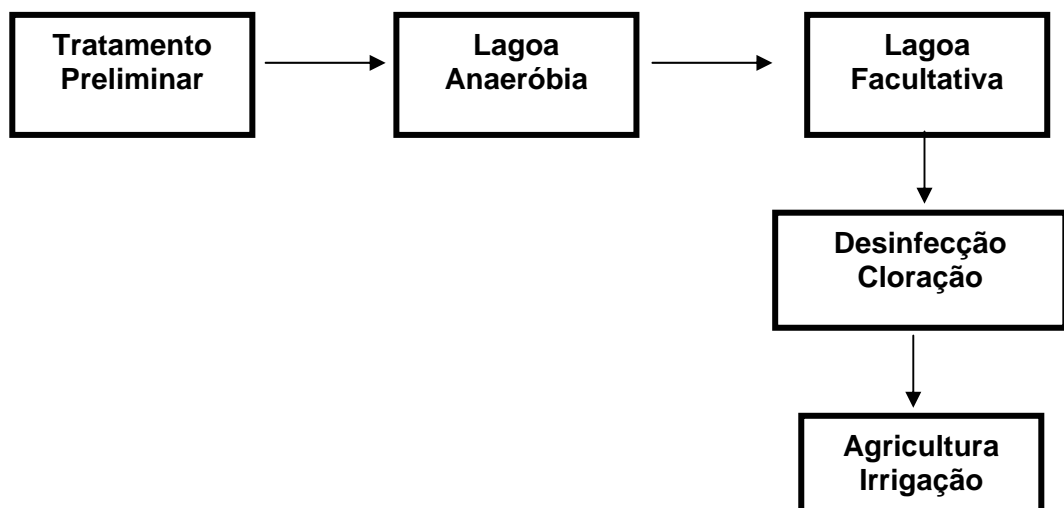


Figura 2: Sistema de tratamento de esgotos sanitários, utilizado no município de Lins – SP e unidade de desinfecção.

O sistema de Lagoas de Estabilização (Lagoa Anaeróbia e Facultativa) e a Unidade de Desinfecção podem ser vistos nas Figuras 3, 4, e 5, respectivamente.



Figura 3: Vista parcial da Lagoa Anaeróbia



Figura 4: Vista panorâmica da Lagoa Facultativa



Figura 5: Unidade piloto utilizada para o tratamento por hipoclorito de sódio do efluente da lagoa facultativa

5.2. Amostras e Amostragem

As amostras foram coletadas quinzenalmente, no período entre julho de 2001 a novembro de 2002 (Tabela 1), perfazendo um total de 29 campanhas de amostragem. Estas eram provenientes dos seguintes pontos: entrada anaeróbia (EA); saída anaeróbia (SA); saída facultativa (SF) e amostras do efluente submetido ao processo de desinfecção por hipoclorito de sódio (UD) (com distintas dosagens e tempos de contato).

A pesquisa de *Aeromonas* spp foi executada no Laboratório de Saúde Pública do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP. As variáveis abióticas: Temperatura do Ar e Água, pH, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO),

Nitrogênio Amoniacal, Fósforo Total, e Sólidos Suspensos Totais, e as análises de Coliformes Totais e *E. coli*, foram realizadas no Laboratório de Qualidade da Água do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da USP.

5.3 Determinação das Variáveis Abióticas

Para determinação das variáveis abióticas, foram utilizados o Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB, 1986) e o Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (19th ed., 1995).

Para os dados obtidos no campo durante a coleta de amostras: temperatura da água, e do ar foi utilizado termômetro de mercúrio graduado em décimo de grau centígrado (°C);

A determinação do pH foi realizada por intermédio de fitas de medição de pH no momento da coleta e no laboratório utilizando o medidor DMPH-2 DIGIMED.

Para análise da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) as amostras coletadas em frascos aferidos, com capacidade de 300 mL e tampa chanfrada foram levadas para o laboratório, mantidas em incubadoras a 20 °C, e após cinco dias analisadas;

As amostras para análise de Nitrogênio Amoniacal foram coletadas em frasco escuro com capacidade de 500 mL, levadas ao laboratório, e analisadas por destilação e titulação com ácido sulfúrico.

Para determinação do Fósforo Total as amostras foram coletadas em frasco escuro com capacidade de 500 mL, e analisadas por digestão ácida e colorimetria (método do ácido ascórbico).

Os sólidos suspensos foram analisados por filtração, utilizando filtro de 1,2 μ , seguido de secagem em estufa.

5.4 Pesquisa de *Aeromonas* spp

A pesquisa de *Aeromonas* spp foi realizada através de cultivo em diferentes meios de cultura: Ágar Sangue Ampicilina (ASA) contendo 10 μ g/mL de ampicilina, segundo MATTÉ 1995; Ágar Amido Ampicilina, de acordo com PALUMBO et al. 1985 e Ágar MacConkey de acordo com a metodologia descrita por FALCÃO et al. 1998. A composição dos meios de cultura está descrita no anexo I.

No decorrer da pesquisa optou-se pela utilização somente do meio ágar sangue ampicilina (ASA), pois foi observada uma melhor especificidade deste meio para o crescimento das espécies de *Aeromonas*.

A determinação do número de organismos pertencentes ao gênero *Aeromonas* foi realizada pela técnica de tubos múltiplos (NMP/100 mL) durante o período de julho de 2001 a março de 2002, perfazendo um total de 14 determinações. E no período de abril de 2001 a novembro de 2002, deu-se a continuidade com a determinação da presença e ausência (PA) deste grupo de bactérias, totalizando 29 determinações.

5.4.1. Procedimentos de Campo

A coleta de amostras foi realizada com frascos de polipropileno estéreis. Após a coleta as amostras foram conservadas sob refrigeração (4-10°C) até o momento da análise não excedendo o período máximo de 24 horas, até o processamento no laboratório.

5.4.2 Presença ou Ausência (PA)

Para determinação qualitativa de *Aeromonas* spp foram semeados 100 mL de cada amostra em 100 mL de caldo de enriquecimento, concentração dupla, água peptonada alcalina (APA) contendo 1% de cloreto de sódio (pH 8,6), de acordo com MATTÉ 1995. As amostras foram então incubadas por 24 horas a 35°C.

Após o período de incubação, a partir de cada caldo de enriquecimento, foi semeada uma alçada do material da superfície de crescimento bacteriano em 10 placas de Petri, contendo ASA, e incubadas por 24 horas a 35°C, como apresentado na Figura 6.

A utilização de 10 placas por amostra, teve por finalidade aumentar a probabilidade de isolamento de colônias típicas do gênero *Aeromonas*, frente à presença de organismos contaminantes presentes no esgoto e que pudessem interferir na amostragem.

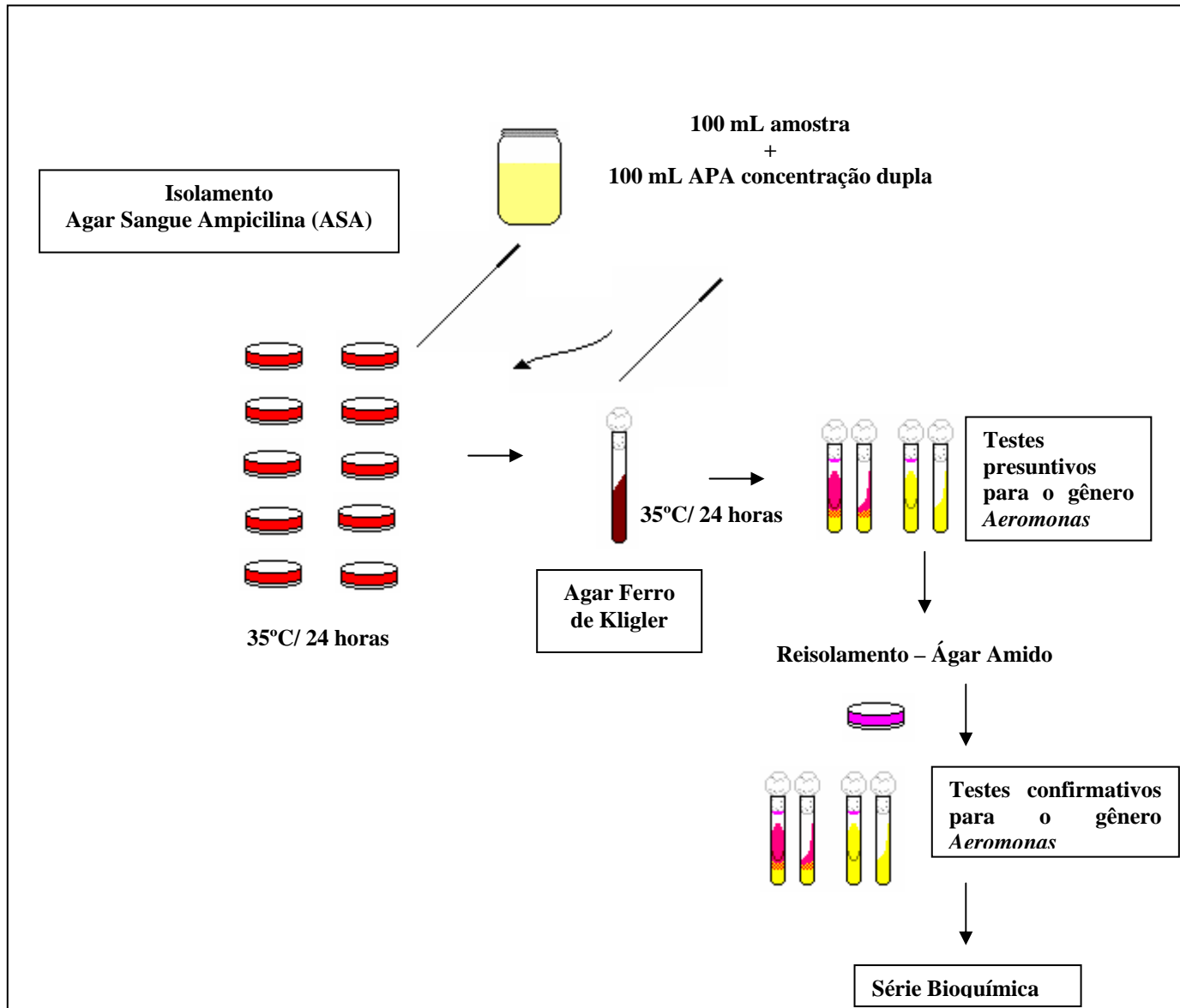


Figura 6:– Esquema representativo do procedimento utilizado para a pesquisa de organismos do gênero *Aeromonas* em amostras provenientes de efluentes das diferentes etapas do sistema de lagoas de estabilização e da unidade de desinfecção.

5.4.3 Determinação do Número Mais Provável de *Aeromonas* spp

A determinação do número de organismos pertencentes ao gênero *Aeromonas* foi realizada pela técnica de tubos múltiplos, com emprego de série de três tubos, de acordo com o preconizado pela APHA (1995), e descrito por MATTÉ (1995).

Foram realizadas diluições seriadas decimais, utilizando solução fisiológica, para as amostras em estudo, sendo de 10^0 a 10^{-8} , para as amostras da entrada anaeróbia, saída anaeróbia e saída facultativa, e de 10^0 a 10^{-6} para as amostras provenientes do sistema de desinfecção por cloro.

5.4.4 Enriquecimento das amostras

As amostras foram semeadas, a partir das diluições, para o caldo de enriquecimento água peptonada alcalina (APA) contendo 1% de cloreto de sódio (pH 8,6) e incubadas por 24 horas a 35°C, como ilustrado na Figura 7. Após o período de incubação, a partir de cada tubo de enriquecimento, foi semeada uma alça do material da superfície do crescimento bacteriano em 3 placas de Petri contendo ASA, as quais foram incubadas por 24 horas a 35°C (MATTÉ 1995).

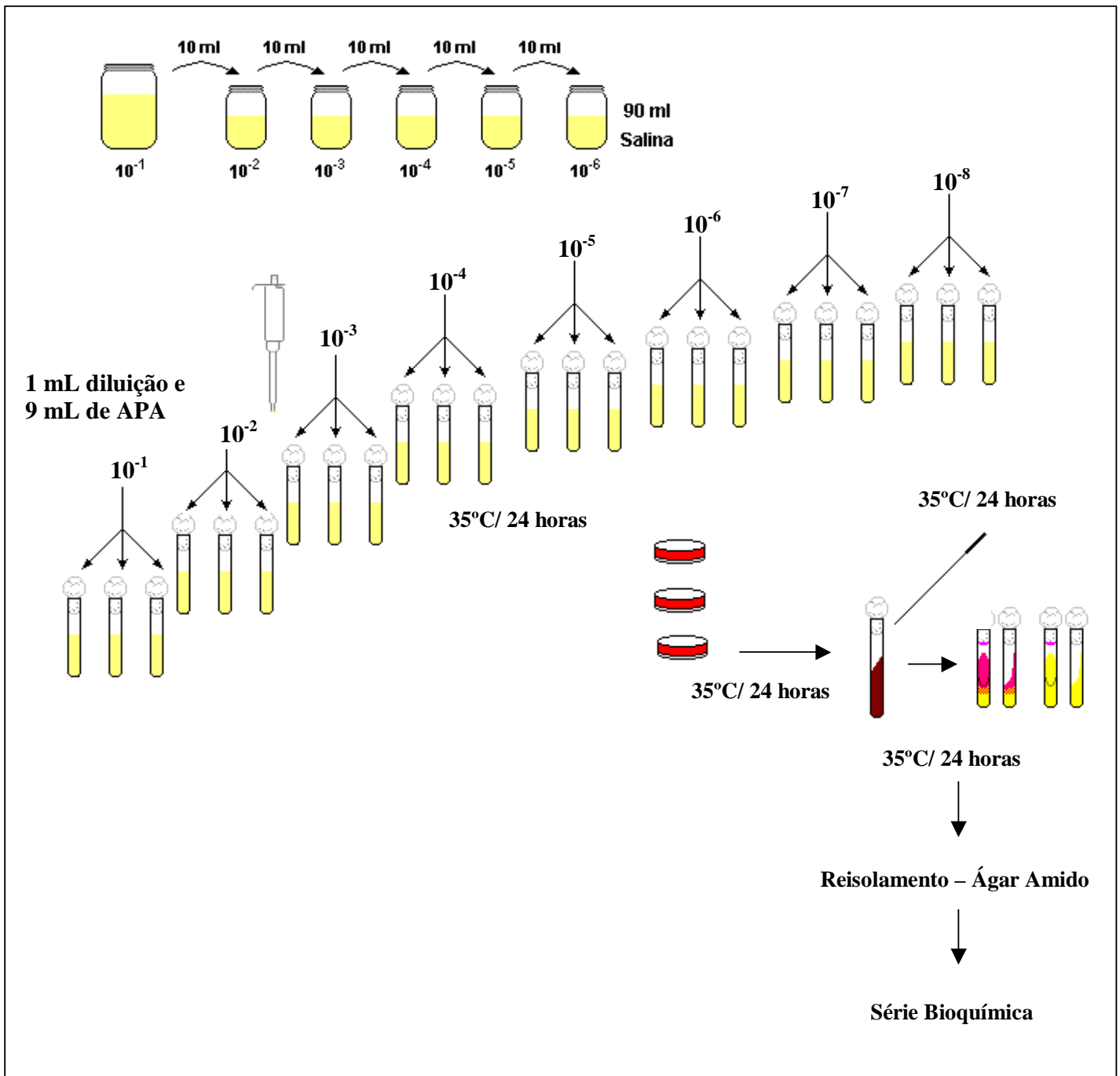


Figura 7: Esquema representativo do procedimento da técnica dos tubos múltiplos para a determinação do número mais provável de organismos do gênero *Aeromonas* em amostras provenientes de efluentes das diferentes etapas do sistema de lagoas de estabilização e da unidade de desinfecção.

5.4.5 Isolamento das colônias

A partir das placas de ASA, dos testes de PA e NMP, as colônias que apresentaram características típicas do gênero *Aeromonas*, com diâmetro entre 2 a 3 mm, brilhantes e convexas, com ou sem hemólise, e ainda teste positivo para produção da enzima citocromo oxidase foram transferidas para meio de Ágar Ferro de Kligler, para a determinação de produção de indol, acidificação da lactose, fermentação da glicose e produção de gás.

As colônias que apresentaram testes presuntivos positivos para *Aeromonas* spp foram submetidas ao reisolamento em Placa de Petri contendo Ágar Amido sem adição de ampicilina (AA) e incubadas por 24 horas a 35°C.

Após o período de incubação, somente as colônias que apresentaram hidrólise de amido (halo) e reação positiva à prova de oxidase foram novamente transferidas para o meio de Ágar Ferro de Kligler.

5.5 Provas Bioquímicas

As colônias que apresentaram testes positivos para o gênero *Aeromonas* foram submetidas a provas bioquímicas complementares para confirmação de espécie, a saber: arginina dehidrolase, lisina e ornitina descarboxilase, crescimento em concentração de 6% de cloreto de sódio e na ausência deste sal; produção de ácido a partir de: arabinose, manose,

manitol, sacarose, hidrólise da esculina e, Voges-Proskaver. A partir dos resultados obtidos nas provas bioquímicas as cepas foram classificadas, nas diferentes espécies de *Aeromonas*, conforme reações padrão apresentadas no Quadro 2.

Qua2: Características bioquímicas esperadas para as diferentes espécies de *Aeromonas*

Espécie	Arginina	Lisina	Ornitina	Sacarose	Esculina	Manitol	Salicina	Arabinose	Gás	Indol	Ampicilina	Beta hemolítica	VP
<i>A. simiae</i>	+	+	-	+	V	-	-	-	-	-	100	0	
<i>A. hydrophila</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	100	100	92
<i>A. hydrophila dhakensis</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	ND	+	100	95	
<i>A. bestiarum</i>	+	+	-	+	+	+	V +	+	V +	+	94	94	63
<i>A. caviae</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	100	52	0
<i>A. media</i>	+	-	-	+	+	+	V -	+	-	+	73	45	0
<i>A. eucrenophila</i>	+	-	-	V +	+	+	+	V +	+	+	100	89	0
<i>A. sobria</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	V	+	50	0	0
<i>A. veronii sobria</i>	+	+	-	+	-	+	-	V -	+	+	100	100	88
<i>A. culicicola</i>	+	+	-	+	ND	+	-	-	+	+	100	100	
<i>A. veronii veronii</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	V +	+	100	100	70
<i>A. jandaei</i>	+	+	-	V +	-	+	-	-	+	+	93	100	87
<i>A. encheleia</i>	+	-	-	V +	+	+	+	-	V +	+	100	75	0
<i>A. schubertii</i>	+	V +	-	-	-	-	-	-	-	-	92	75	17
<i>A. trota</i>	+	+	-	V -	-	V +	-	-	V +	+	6	50	0
<i>A. allosaccharophila</i>	V +	+	V -	+	V +	+	-	V +	+	+	100	33	0
<i>A. popoffii</i>	+	-	-	-	-	+	-	V	+	V +	100	0	86
<i>A. salmonicida</i>	69	46	0	100	85	100	31	100	77	100	85	69	62

Fonte: Pidiyar *et al.* 2002; Abbott *etal.* 2003; Harf-Monteil *et al.* 2004

5.6. Perfil Plasmidial das cepas de *Aeromonas* isoladas

O estudo do perfil plasmidial foi realizado para os isolados de *Aeromonas* spp provenientes do efluente tratado com cloro (unidade de desinfecção), perfazendo um total de 71 cepas.

5.6.1 Extração de Plasmídios

A extração de DNA plasmidial foi realizada conforme descrito por BIRNBOIM & DOLY 1979.

Foi semeada em 3 mL de caldo lúria permanecendo 17-24 horas a 35°C (anexo II) “*overnight*”, 0,5 mL de cada caldo de cultura da cepa bacteriana foi transferida para um tubo tipo “eppendorf”, submetido a centrifugação de 5.000 rpm/10 minutos a 24°C; o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso com 1 mL de salina 0,85% estéril; o material ressuspenso foi transferido para um outro “eppendorf” e centrifugado a 12.000 rpm/5 minutos a 24°C; o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL a solução I (anexo II). O precipitado ressuspenso foi incubado em banho de gelo por 30 minutos.

A cada tubo foram adicionados 200 µL da solução II (anexo II) os tubos agitados por inversão, e incubados em banho de gelo por 5 minutos, a seguir foram adicionados 150 µL da solução III (anexo II), seguido de homogeneização por inversão, até ser observada a formação de um precipitado branco floculento, após o que foi realizada incubação em

banho de gelo por uma hora e trinta minutos. Após este período cada tubo foi centrifugado a 4°C por 15 minutos à velocidade de 12.000 rpm. Os sobrenadantes (aproximadamente 400 µL) foram transferidos para outros tubos “*eppendorf*”; em seguida a cada um deles foi adicionado 1 mL de etanol P.A. gelado (-20°C) acompanhado pelo mesmo tipo de homogeneização, e incubação por uma hora a -20°C

Na seqüência do procedimento, os tubos foram centrifugados à velocidade de 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C; os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 100 µL de solução IV (anexo II), agitados, e em seguida adicionados de 250 µL de etanol P.A. gelado (-20°C) sendo então realizada outra homogeneização por inversão, e incubação por 18 horas a -20°C.

No dia seguinte, após a centrifugação por 15 minutos a 4°C e 12.000 rpm, os sobrenadantes foram descartados e aos precipitados foi adicionado etanol (1 mL) 70% gelado (-20°C); e a seguir submetidos a centrifugação pela mesma temperatura e velocidade por 10 minutos e descartando-se os sobrenadantes. Após a secagem dos sedimentos, em dessecador, os conteúdos dos tubos foram reidratados em 15 µL de tampão TE II (anexo II).

5.6.2 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da extração de plasmídeo foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (anexo II) em intensidade de

corrente de 80v por 4 horas para detecção da presença de bandas de plasmídios, os quais foram visualizados por coloração do gel de agarose com brometo de etídio e observados em fonte de luz ultravioleta.

A imagem foi obtida através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP). A medida dos fragmentos foi determinada pelo software Gelworks 1D Advanced V.4.01.

5.7 Análise dos Dados

Os dados referentes às variáveis abióticas do sistema de lagoa de estabilização e o sistema de desinfecção por cloro foram apresentados em tabelas.

Com base nos isolados confirmados bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Aeromonas* foi determinado o número mais provável de organismos nas diferentes amostras com base na tabela de NMP descrita no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th 1995.

Com base nos isolados confirmados bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Aeromonas* foram determinados o número total de cepas e sua frequência (%).

Foi aplicado entre as variáveis abióticas e bióticas: O teste de correlação não paramétrico de Spearman aos pares de variáveis: *Aeromonas* spp, coliforme total, *E. coli*, Demanda Bioquímica de Oxigênio,

Nitrogênio Amoniacal, Fósforo total, Sólidos Suspensos Totais, Temperatura da água e pH.

6. RESULTADOS

A pesquisa de organismos pertencentes ao gênero *Aeromonas*, foi realizada nas diferentes etapas do sistema por lagoas de estabilização em Lins, São Paulo, no período de julho de 2001 a novembro de 2003 (Anexo III-D).

Foram analisadas 113 amostras de água, provenientes do sistema de lagoas de estabilização e da unidade de desinfecção por cloro. Dessas amostras foram isoladas e submetidas à triagem 2074 cepas, sendo que destas, 416 (Tabela 4) foram confirmadas por meio de provas bioquímicas como pertencentes ao gênero *Aeromonas*.

6.1 Ocorrência de *Aeromonas*

Das 29 coletas realizadas para a verificação de *Aeromonas*, foi observado que 72,4% (21) das amostras do ponto correspondente à entrada da lagoa anaeróbia, 55,1% (16) das amostras correspondentes à saída da lagoa anaeróbia, 48,3% (14) da saída da lagoa facultativa, e 53,6% (17) das amostras do tanque de cloro apresentavam bactérias do gênero *Aeromonas* (Tabela 1).

O número estimado (NMP/100 mL) de organismos isolados ao longo do sistema de lagoas de estabilização variou entre <3 e 3×10^9 organismos/100mL de amostra para a entrada da lagoa anaeróbia, entre <3 e 3×10^9 organismos /100 mL para a saída da lagoa anaeróbia,

entre <3 e 9×10^5 para a saída da lagoa facultativa e entre <3 e 9×10^5 para o tanque de cloro como relacionados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 1: Presença e ausência de *Aeromonas* spp ao longo do sistema de lagoas de estabilização e na unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio no período de julho de 2001 a novembro de 2002 – Lins – SP.

Data da Coleta	Entrada Anaeróbia	Saída Anaeróbia	Saída Facultativa	Unidade de Desinfecção
02.07.01	+	*	+	+
07.08.01	+	-	+	+
04.09.01	+	+	+	+
02.10.01	+	+	-	-
23.10.01	+	-	-	-
06.11.01	+	+	+	+
03.12.01	-	-	-	-
17.12.01	+	+	-	+
07.01.02	+	-	-	-
21.01.02	+	+	+	-
04.02.02	+	+	+	*
19.02.02	+	+	-	-
06.03.02	-	-	+	+
18.03.02	+	-	+	+
02.04.02	-	+	+	+
17.04.02	+	+	+	+
08.05.02	-	-	-	-
20.05.02	+	-	-	-
03.06.02	+	+	+	+
25.06.02	-	+	+	+
11.07.02	-	+	+	+
24.07.02	+	-	-	+
08.08.02	+	-	-	+
19.08.02	-	+	-	+
11.09.02	+	-	-	-
25.09.02	-	-	-	-
08.10.02	+	+	-	+
22.10.02	+	-	-	*
06.11.02	+	+	+	+

21 (72,4%) 16 (55,1%) 14 (48,3%) 17 (53,6%)

Presença = (+); Ausência = (-) (*) = Não houve coleta.

Tabela 2: Número mais provável de *Aeromonas* spp em amostras correspondentes aos diferentes pontos de amostragem do sistema de lagoas de estabilização no período de julho de 2001 a março de 2002 – Lins – SP.

Data da Coleta	Entrada Anaeróbia	Saída Anaeróbia	Saída Facultativa
02.07.01	$4,0 \times 10^7$	–	<3
07.08.01	$4,0 \times 10^3$	<3	$4,0 \times 10^5$
04.09.01	$7,0 \times 10^8$	$7,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^3$
02.10.01	$1,1 \times 10^9$	$7,0 \times 10^6$	<3
23.10.01	$2,1 \times 10^8$	<3	<3
06.11.01	$9,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$
03.12.01	<3	<3	<3
17.12.01	$3,0 \times 10^9$	$7,0 \times 10^6$	<3
07.01.02	$3,0 \times 10^9$	<3	<3
21.01.02	$1,1 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^4$
04.02.02	$3,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$
19.02.02	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	<3
06.03.02	<3	<3	$4,0 \times 10^4$
18.03.02	$3,0 \times 10^5$	<3	$7,0 \times 10^4$

Tabela 3: Número mais provável de *Aeromonas* spp em amostras dos ensaios, submetidas à desinfecção com hipoclorito de sódio no período de julho de 2001 a março de 2002 – Lins – SP.

Data da coleta	Dosagem (mg/L)	Tempo de contato (minutos)	<i>Aeromonas</i> spp (NMP/100 mL)
02.07.01	15	20	<3
07.08.01	3,0	40	$1,1 \times 10^5$
04.09.01	10	30	$4,3 \times 10^5$
02.10.01	7,0	20	$4,0 \times 10^3$
23.10.01	10,6	30	<3
06.11.01	26,6	20	$9,0 \times 10^5$
03.12.01	15	35	<3
17.12.01	15,2	40	$9,3 \times 10^4$
07.01.02	15,4	40	<3
21.01.02	15,0	40	<3
04.02.02	6,4	40	<3
19.02.02	9,5	30	<3
06.03.02	2,1	12	$1,1 \times 10^3$
18.03.02	8,0	30	$1,5 \times 10^3$

A aplicação de testes bioquímicos para a identificação de *Aeromonas* spp revelou uma grande diversidade de espécies em todos os pontos de amostragem, totalizando a presença de 14 espécies deste gênero no sistema, a saber: Na entrada anaeróbia apresentou 37,9 % (11) das espécies encontradas, na saída anaeróbia 11,5% (8) e a saída facultativa 18,0% (9). No tanque de cloração foram observados 32,4% (11) das espécies.

As diferentes espécies de *Aeromonas* encontradas durante o período de estudo foram: *Aeromonas allossaccharophila* 22,8% (95), *A. bestiarium* 4,8% (20), *A. caviae* 20,4% (85), *A. encheleia* 0,5% (2), *A. eucrenophila* 0,5% (2), *A. hydrophila* 3,4% (14), *A. jandaei* 1,0% (4), *A. media* 10,3% (43), *A. popoffii* 1,9% (8), *A. salmonicida* 10,0% (42), *A. schubertii* 0,75% (3), *A. trota* 3,8% (16), *A. veronii sobria* 4,3% (18), *A. veronii veronii* 0,5% (2). Embora 14,9% (62) apresentassem características do gênero *Aeromonas*, os organismos demonstraram reações bioquímicas atípicas e foram considerados *Aeromonas* spp.

A Tabela 4 apresenta as diferentes espécies de *Aeromonas*, e respectivas porcentagens nos diferentes pontos de amostragem no tratamento de lagoas e processo de desinfecção.

Tabela 4: Espécies de *Aeromonas*, número e porcentagem, observados, segundo a etapa do sistema de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização e na unidade de desinfecção, Lins/SP, 2001-2002.

Espécies	Entrada Anaeróbia		Saída Anaeróbia		Saída Facultativa		Unidade de desinfecção	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>A. sp</i>	31	19,6	7	14,6	15	20,0	9	6,7
<i>A. allosaccharophila</i>	28	17,7	6	12,5	35	46,6	26	19,3
<i>A. bestiarium</i>	3	2,0	1	2,1	2	2,7	14	10,4
<i>A. caviae</i>	53	33,5	12	25	6	8,0	14	10,4
<i>A. encheleia</i>	1	0,6	–	–	–	–	1	0,7
<i>A. eucrenophila</i>	–	–	–	–	–	–	2	1,5
<i>A. hydrophila</i>	5	3,2	1	2,1	–	–	8	5,9
<i>A. jandaei</i>	2	1,3	–	–	–	–	2	1,5
<i>A. media</i>	11	7,0	8	16,6	4	5,4	20	14,7
<i>A. popoffii</i>	–	–	1	2,1	7	9,4	–	–
<i>A. salmonicida</i>	12	7,6	11	22,9	–	–	19	14,1
<i>A. schubertii</i>	–	–	–	–	3	4,0	–	–
<i>A. trota</i>	3	1,9	1	2,1	1	1,3	11	8,1
<i>A. veronii sobria</i>	8	5,0	–	–	1	1,3	9	6,7
<i>A. veronii veronii</i>	1	0,6	–	–	1	1,3	–	–
Total	158	100,0	48	100,0	75	100,0	135	100,0

6.2 Dinâmica de remoção de *Aeromonas* no sistema

Como é possível observar nas Tabelas 2 e 3, a dinâmica de remoção de *Aeromonas* no sistema de lagoas de estabilização e desinfecção com cloro apresentou uma tendência de redução em número, porém sua total remoção não foi observada em todas das amostragens.

6 3. Dinâmica de remoção de *Aeromonas* spp e *Escherichia coli* no sistema

Para uma melhor avaliação do sistema em estudo foram obtidos dados de contagens de *Escherichia coli* (Anexo III - E) ao longo do sistema e comparados com os valores obtidos para *Aeromonas* spp. As contagens de *E. coli* observadas por RAZZOLINI 2003, no mesmo sistema demonstraram que a dinâmica de remoção desses organismos apresenta um comportamento distinto do observado no presente estudo para organismos do gênero *Aeromonas*. Essa diferença pode ser observada na Figura 8 que representa as contagens de *E. coli* e *Aeromonas* spp nos diferentes pontos de amostragens do sistema de lagoas de estabilização e tanque de desinfecção por cloro.

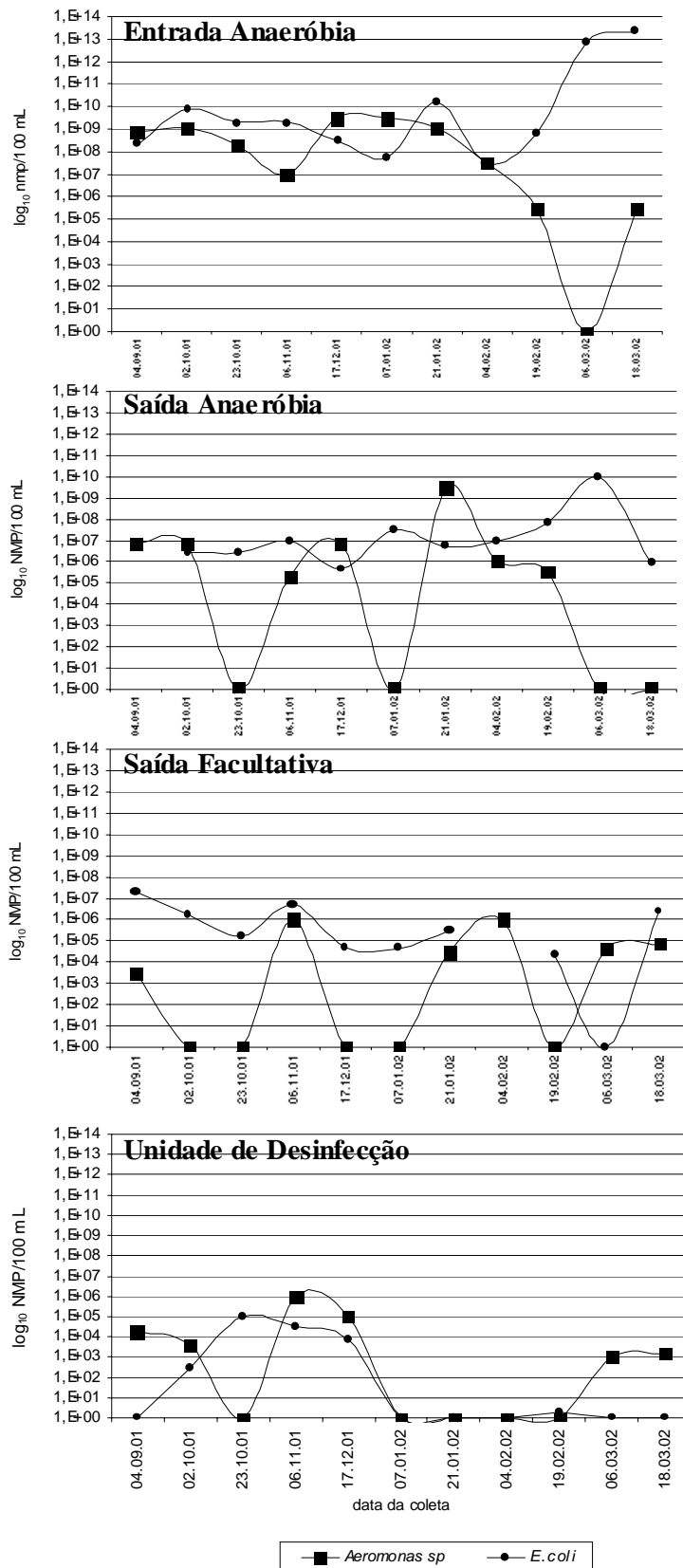


Figura 8: Dinâmica das concentrações de *Aeromonas* e *E. coli* nos diferentes pontos de amostragem do sistema de lagoas de estabilização e do sistema de desinfecção.

6.4 Variáveis abióticas

Os resultados obtidos correspondentes aos parâmetros físicos e químicos estudados (temperatura, pH, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio amoniacal, fósforo total, e sólidos suspensos totais) foram utilizados para caracterização do sistema de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização. Estes parâmetros estão apresentados nas Anexo III A e B.

Foi observado que a temperatura da água, durante todo o experimento, oscilou entre 23 e 32°C, sendo que para a entrada da lagoa anaeróbia os valores variaram entre 23 e 32°C, para a saída da lagoa anaeróbia os valores observados foram entre 23 e 31,5°C, para a saída da lagoa facultativa entre 23 e 32°C, e para o tanque de cloro os valores de temperatura observados estavam entre 23,5 e 30°C.

O pH do sistema variou entre 6,0 e 8,0 sendo que na entrada e saída da lagoa anaeróbia o pH máximo obtido no momento da coleta foi de 7,0, enquanto que na saída da lagoa facultativa e tanque de desinfecção por cloro foi observado o valor máximo de pH 8,0.

Durante o estudo foi observado que os valores da DBO do efluente da lagoa facultativa ultrapassaram o padrão de emissão de 60 mg/L em algumas ocasiões.

As concentrações de nitrogênio amoniacal e fósforo total também podem ser consideradas elevadas em alguns episódios no efluente da lagoa facultativa, bem como no efluente clorado.

Os efluentes da lagoa facultativa e do tanque de cloro apresentaram concentrações de sólidos em suspensão elevados atingindo valores de 200 mg/L.

Apesar de vários fatores abióticos, tanto de caráter ambiental quanto advindos da presença do homem, que podem influir direta ou indiretamente sobre a presença de *Aeromonas* spp nesses ambientes, não foi possível observar valores de correlação significativos para nenhum dos fatores abióticos analisados, de acordo com o método estatístico de correlação de Pearson.

6.5 Análise do Perfil Plasmidial do gênero *Aeromonas*

Neste estudo foram analisadas 71 cepas de *Aeromonas* spp da unidade de desinfecção por cloro sendo que 83,0% das cepas de *Aeromonas* analisadas para a presença desses elementos extracromossômicos apresentaram pelo menos 1 plasmídio.

A Tabela 5 apresenta o número de plasmídios e perfil plasmidial das cepas de *Aeromonas* isoladas na unidade de Desinfecção por hipoclorito de sódio – Lins – SP.

A Figura 10 apresenta em relação ao tanque de desinfecção por cloro, o número de plasmídios e as respectivas porcentagens observadas nas *Aeromonas* estudadas.

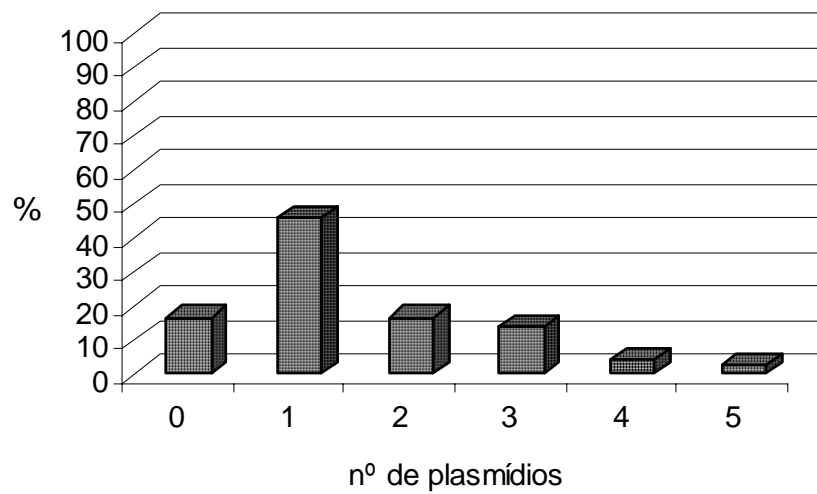


Figura 10: Número de plasmídios, e porcentagem das cepas de *Aeromonas* spp isoladas do tanque de desinfecção por cloro.

Foi observado, no presente estudo, que as cepas estudadas apresentaram perfis diversificados, com plasmídios que variaram em peso molecular entre 0,5 e 80 Kb, como pode ser observado na Figura 9.

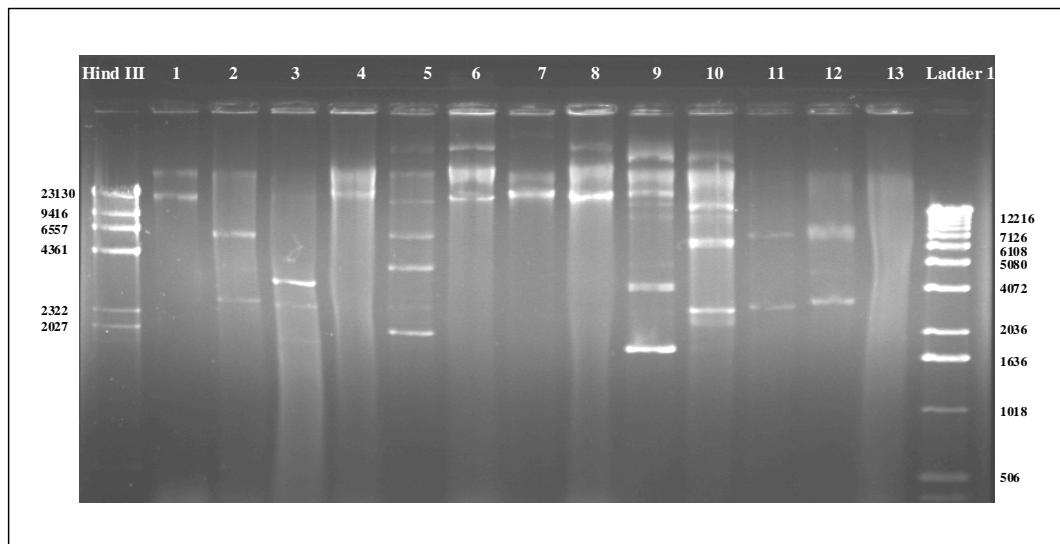


Figura 9: Perfil plasmidial de cepas de *Aeromonas* isoladas de amostras do tanque de desinfecção por cloro utilizando metodologia de Birnboim & Doly, 1979. Hind III - Marcador de peso molecular; Linhas 1,6,7,8,11,13 *Aeromonas caviae*; Linhas 2,3,4,5,9 – *Aeromonas hydrophila*; Linha 10: *Aeromonas veronii sobria*; Linha 12: *Aeromonas trota*; 1kb DNA Ladder Marcador de peso molecular.

Tabela 5: Distribuição das cepas de diferentes espécies de *Aeromonas*, provenientes do tanque de desinfecção por cloro, segundo o número de plasmídios observados – São Paulo – 2001/2002.

Espécie	Nº da cepa	Nº de Plasmídios	Peso molecular Kb
<i>Aeromonas media</i>	239	3	15; 23 ; 40
	251	1	23
	257	1	23
	258	1	23
	264	3	15 ;30; 40
	267	1	30
	268	0	–
	277	0	–
	438	1	23
	459	1	23
	464	3	2,5 ; 4,5 ;23
	2071	2	2,0 ;4,0
	2072	1	23
	2074	0	–
	2075	1	23
	2076	1	30
2210	1	23	
2214	1	23	
<i>Aeromonas trota</i>	622	1	23
	906	1	23
	907	1	30
	908	4	1,5 ;3,0 ; 5,0 ; 23
	1453	1	23
	1791	1	23
<i>Aeromonas caviae</i>	205	2	23 ; 30
	228	1	23
	235	1	12
	243	1	23
	250	3	23 ; 30; 80
	252	0	–
	262	1	23
	263	1	30
	269	1	23
	407	1	12
	408	0	–
	416	0	–
	1473	1	23
1577	1	30	

Tabela 5: Distribuição das cepas de diferentes espécies de *Aeromonas*, provenientes do tanque de desinfecção por cloro, segundo o número de plasmídios observados – São Paulo – 2001/2002 (Continuação).

	140	2	12 ;23
	405	0	–
<i>Aeromonas veronii sobria</i>	418	2	23 - 30
	449	5	4,0 ; 6,0 ;7,0; 10; 23
	624	2	15; 23
	414	1	23
<i>Aeromonas allossaccharophila</i>	467 a	1	23
	467 b	3	3, 0 ; 5,0 ; 30
	1723	1	23
	620	2	15; 23
<i>Aeromonas jandaei</i>	626	1	23
	204	2	12; 23
	206	0	–
	209	0	–
	210	3	2; 2,5; 30
	211	4	1; 3,5; 12; 30
<i>Aeromonas bestiarium</i>	212	4	1,5; 3; 5; 50
	213	2	23; 30
	214	1	30
	215	3	1,5; 4; 30
	417	1	23
	456	2	23; 30
	194	2	7; 23
	203	2	12; 23
	222	3	2; 4; 12
<i>Aeromonas hydrophila</i>	234	3	1; 5; 12
	275	2	0,5; 4
	278	5	1,5; 4; 5; 12; 30
	419 a	0	–
	419 b	0	–
	429	0	–
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	1720	1	23
<i>Aeromonas encheleia</i>	270	3	2; 3; 23

*Classificação bioquímica das espécies de acordo com Pidiyar *et al.* 2002; Abbott *et al.* 2003; Harf-Monteil *et al.* 2004

7. DISCUSSÃO

Organismos pertencentes ao gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídos no ambiente aquático sendo, atualmente, considerados como organismos emergentes (ARAÚJO *et al.* 1991; SINGH & SANGAL 1992; MATTÉ 1995; MERINO *et al.* 1995; JANDA & ABBOTT 1998; COWAY & ROPER 2000; JOSEPH & CARNAHAN 2000).

A capacidade de produzir doenças em diferentes espécies animais, já está muito bem estabelecida e documentada na literatura científica. Porém, o potencial de membros do gênero *Aeromonas* em causar doenças no homem, vem sendo estudado ao longo do tempo, mas só recentemente, um maior número de casos clínicos têm sido confirmados e atribuídos a esses organismos (JANDA & ABBOTT 1996; JOSEPH & CARNAHAN 2000; VILA *et al.* 2003; CLARK & CHENOWETH 2003).

A ubiqüidade de *Aeromonas* spp, proporcionada pela sua facilidade de adaptação em diversos tipos de ambientes aquáticos, tem sido uma das motivações para o desenvolvimento de pesquisas objetivando conhecer a real distribuição desses organismos, bem como os fatores relacionados a sua sobrevivência e virulência, procurando elucidar as possíveis fontes e vias de transmissão (MATTÉ 1995).

Assim como outros patógenos emergentes, para esses microrganismos não há uma rotina diagnóstica bem estabelecida quer seja na área clínica, de alimentos ou ambiental, o que dificulta o conhecimento de

sua real ocorrência. A ausência de padronização de metodologias específicas para estudo desse grupo de microrganismos, aliado ao pouco conhecimento por parte dos técnicos envolvidos na análise microbiológica, tanto de amostras clínicas quanto ambientais, são fatores que indicam que os dados atualmente disponíveis encontram-se subestimados (MATTÉ 1995, 1996; JOSEPH & CARNAHAN 2000; HUYS *et al.* 2002, 2003; PIDIYAR *et al.* 2002; PARK *et al.* 2003).

Este fato foi confirmado com o estudo desenvolvido por PARK *et al.*, (2003) que observaram que os organismos do gênero *Aeromonas* podem ser erroneamente identificados pelo sistema VITEK de identificação bacteriana, muito utilizado em laboratórios de análises clínicas e hospitais.

7.1 Presença de *Aeromonas*

A pesquisa de *Aeromonas* nos diferentes tipos de ambientes aquáticos, e em amostras clínicas realizada no Brasil, revelou que são escassas as publicações que contemplam este tema, demonstrando pouco interesse ou mesmo desconhecimento dessas bactérias em nosso país (MATTÉ 1995; FALCÃO *et al.* 1998; BAUAB 2000).

Por outro lado, é notório o crescente interesse da comunidade científica internacional pela avaliação deste tema, o que pode ser observado devido ao aumento de publicações envolvendo organismos do gênero *Aeromonas* (VILLARI *et al.* 2000; SZABO *et al.* 2000; McMAHON

& WILSON 2001; IVANOVA *et al.* 2001; MASSA *et al.* 2001; BENCHOKROUN *et al.* 2003; PIANETTI *et al.* 2004).

No que se refere à presença de *Aeromonas* spp no sistema de tratamento de esgoto, um pequeno número de estudos foi publicado buscando elucidar o significado da presença desses organismos nestes sistemas e sua importância para a saúde pública. (MONFORT & BALEUX 1990, 1991; BOUSSAID *et al.* 1991; HASSANI *et al.* 1992; BAHLAOUI *et al.* 1997; IMZLIM *et al.* 1998; BENCHOKROUN *et al.* 2003; MAALEJ *et al.* 2003; PIANETTI *et al.* 2004).

Esta pesquisa revelou a ocorrência de organismos pertencentes ao gênero *Aeromonas* nas diferentes etapas do processo de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização. Esse é o primeiro estudo, no Brasil, demonstrando a dinâmica desses organismos ao longo de um sistema de lagoas de estabilização para tratamento de esgoto.

Os resultados demonstraram a dinâmica de ocorrência de *Aeromonas* spp no sistema de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização no município de Lins, esses organismos estão presentes em maior número no início do tratamento, isto é, na lagoa anaeróbia, e decrescem ao longo do sistema, porém apresentando uma flutuação indicando uma inconstância na sua remoção.

Os resultados observados corroboram aqueles de PARODI e PESO, (1983) que investigaram a presença de organismos do gênero *Aeromonas* em água residual proveniente de esgoto na cidade de

Buenos Aires. Esses autores destacam como relevante sua pesquisa em águas residuárias.

MONFORT e BALEUX, (1990), estudaram a dinâmica de *Aeromonas* num sistema de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização na cidade de Mèze, na França. Os autores observaram que *Aeromonas* estavam presentes em todas as etapas do processo de tratamento em contagens que variaram entre 10^2 e 10^7 , dados que são semelhantes aos observados no presente estudo, onde foram observadas variações entre $3,0 \times 10^9$ - < 3 organismos/100 mL.

Um estudo realizado no Marrocos, em 1991, demonstrou a presença de *Aeromonas* no sistema de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização, onde as maiores concentrações do organismo foram obtidas na entrada do sistema, ou seja o esgoto bruto. Os autores observaram a presença de *Aeromonas* no efluente final do sistema em contagens médias de 10^3 bactérias/mL. Esses resultados assemelham-se aos obtidos no presente trabalho, quanto à dinâmica de decaimento de *Aeromonas* no sistema, porém as contagens diferem, provavelmente devido ao tempo de detenção empregado (considerado pelos autores um dos principais responsáveis pelo decaimento de organismos) que, no caso de Marrocos é de 50 dias, enquanto no município de Lins é de 15 dias (BOUSSAID *et al.*, 1991).

HASSANI *et al.*, (1992) estudaram a incidência de espécies de *Aeromonas* no esgoto bruto e no efluente final após tratamento em lagoas de estabilização na cidade de Marrakech, Marrocos. Os

resultados deste estudo revelaram que *Aeromonas* estavam presentes em abundância no início do sistema de tratamento e constataram o decaimento desses organismos ao longo das lagoas, porém não houve remoção total com o tratamento por este processo. Os autores afirmam também que foi observada uma flutuação significativa nas densidades de *Aeromonas* a cada amostragem. Os dados obtidos pelos autores, corroboram com os achados observados no presente estudo, quanto à dinâmica e também quanto à flutuação das contagens de *Aeromonas* nas diferentes amostragens.

Em um outro estudo realizado na França em 1997, BAHLAOUI *et al.*, observaram o mesmo comportamento na dinâmica de *Aeromonas* no sistema convencional de lagoas de estabilização. Os autores puderam associar as diferenças de concentração desses organismos com as diferenças no tempo de retenção do sistema, ocasionadas pelas diferentes estações do ano. No presente estudo a flutuação das contagens de *Aeromonas* foi também observada, porém informações referentes à vazão do sistema poderiam favorecer a comparação com os dados obtidos na França.

Estes mesmos autores efetuaram um estudo experimental (descrito na Revisão de Literatura) em lagoas de oxidação, notaram que quando a eficiência do tratamento destes dois processos são comparadas, com referência aos seus respectivos tempos de retenção, observa-se que a lagoa de oxidação demonstrou ser mais eficiente.

7.2 Espécies de *Aeromonas* observadas no sistema

A taxonomia complexa da Família *Aeromonadaceae* pode ser evidenciada nos estudos empenhados em agrupar os isolados de *Aeromonas* spp, das diversas fontes, nas diferentes espécies já conhecidas (POPOFF *et al.* 1984; HICKMAN-BRENNER *et al.* 1987, 1988; SCHUBERT & HEGAZI 1988; CARNAHAN & JOSEPH 1991; CARNAHAN *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.* 2004).

Diversos estudos demonstraram que as características bioquímicas desse gênero de microrganismos podem variar de acordo com a fonte de isolamento, e mesmo com características geográficas, favorecendo uma variabilidade de resultados desses testes e dificultando o posicionamento taxonômico dos isolados (JOSEPH & CARNAHAN 2000).

No presente estudo foi demonstrada a presença de diferentes espécies de *Aeromonas* ao longo do sistema de tratamento de esgoto (14 espécies no total) o que representa a maioria das espécies conhecidas desse grupo de organismos.

Por se tratar de amostra de esgoto, na qual o material fecal proveniente do trato intestinal humano é parte fundamental, ressalta-se que a presença de espécies de *Aeromonas*, é claramente esperada, assim como, devido ao alto teor de matéria orgânica. (ARAÚJO *et al.* 1991; BAHLAQUI *et al.* 1997).

No presente estudo, no início do processo (entrada anaeróbia), a espécie *A. caviae* foi identificada com maior frequência, representando 33,5% dos isolados presentes e *A. allosaccharophila* foi a segunda (17,7%). Em comparação com o final do processo (saída da lagoa facultativa), observa-se uma inversão nos percentuais de isolamentos (Tabela 4), onde ocorre o decréscimo de *A. caviae* para 8,0% e incremento de *A. allosaccharophila* para 46,6%. Observações semelhantes foram feitas por outros grupos ao estudarem a dinâmica de *Aeromonas caviae* em sistemas de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização (HASSANI *et al.* 1992; IMZILIN *et al.* 1998).

IMZILIN *et al.* (1998), estudaram isolados de *A. caviae* de diferentes origens ambientais, inclusive provenientes de esgoto bruto e tratado por lagoas de estabilização e observaram, no final do sistema de tratamento, que os isolados de *A. caviae* apresentavam maior potencial de virulência, sugerindo a seleção desses organismos por este processo.

Apesar de não ter sido realizada a pesquisa de fatores de virulência nos isolados de *Aeromonas* neste estudo, foi observado que as espécies remanescentes no efluente final (*A. trota*, *A. schubertii*, *A. veronii sobria* e *A. veronii veronii*) encontram-se entre as consideradas como pertencentes ao grupo das potencialmente patogênicas para o homem (HICKMAN-BRENNER *et al.* 1987, 1988; JOSEPH *et al.* 1991; HUSSLEIN *et al.* 1992; OUDERKIRK *et al.* 2004; ABBOTT *et al.* 2003).

A presença de isolados atípicos de *Aeromonas* (14,9%), que foram classificadas neste estudo como *Aeromonas* sp, revela a grande

diversidade desses organismos, bem como a dificuldade em se determinar através de provas fenotípicas, a posição taxonômica de algumas cepas de *Aeromonas*. Essa mesma dificuldade tem sido encontrada por diferentes pesquisadores ao estudarem isolados de *Aeromonas* de diferentes origens, até mesmo as clínicas (MONFORT & BALEUX 1990; MARTINEZ-MURCIA *et al.* 1992; MATTÉ 1995; ASHBOLT *et al.* 1995; HARF-MONTEIL *et al.* 2004).

7.3 *Aeromonas* e *Escherichia coli*

Vale lembrar que organismos pertencentes ao gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídos no ambiente aquático, e não necessitam de um hospedeiro humano ou animal para se multiplicar (MATTÉ, 1995). Essa característica é diferente das bactérias indicadoras de contaminação fecal, inclusive *E. coli*, que após serem lançadas no ambiente, sobrevivem por um período limitado de tempo e sem se multiplicar (SMOOT & PEARSON 1997).

A comparação da ocorrência de *Aeromonas* e *E. coli* (Figura 8) demonstrou a não existência de correlação entre essas duas variáveis, o mesmo foi observado pelos testes estatísticos, (teste de correlação não paramétrico de Spearman) . Resultados comparáveis também foram obtidos por outros autores (MATTÉ 1995; BAHLAQUI *et al.* 1997; RAZZOLINI 1998; MAALEJ *et al.* 2003).

Essa ausência de correlação pode ser explicada pela diferentes características de cada espécie, sendo que a ocorrência de organismos de origem entérica, como é o caso de *E. coli*, está ligada diretamente com a quantidade de matéria fecal lançada no sistema, bem como com a sobrevivência destes fora do intestino. Em contraste, o gênero *Aeromonas*, que também podem alcançar o sistema de lagoas de estabilização pela via fecal, são primariamente organismos autóctones do ambiente aquático, podendo multiplicar-se nesse ambiente, ou mesmo sofrer modificações na sua dinâmica, em consequência da flora competidora da associação com outros organismos ou de variações de fatores abióticos, como temperatura, pH, salinidade da água, entre outros (HASSANI *et al.* 1992; MATTÉ 1995; RAZZOLINI 1998; MAALEJ *et al.* 2003; BENCHOKROUN *et al.* 2003).

BOUSSAID *et al.* (1991), relataram que o gênero *Aeromonas* spp apresenta maior resistência ao processo de tratamento quando comparado aos coliformes fecais. Os autores também verificaram, no efluente final, uma correlação entre *Aeromonas* spp e presença de matéria orgânica, sugerindo que essa matéria orgânica pode ser resultante da presença de algas no sistema de tratamento.

ARAÚJO *et al.* (1989) e ASHBOLT *et al.* (1995), não observaram correlação significativa entre *Aeromonas* spp e Coliformes Fecais, sugerindo a hipótese de que altas concentrações de substâncias orgânicas favorecem a multiplicação de organismos do gênero *Aeromonas*.

Como demonstrado na tabela do Anexo III - B, resultados semelhantes foram também observados no presente estudo.

Como é possível observar na Figura 8, os resultados revelam ter havido uma inversão nas contagens do gênero *Aeromonas* em comparação às de *E. coli*. BAHLAOUI *et al.* (1997) evidenciaram a mesma tendência, num estudo realizado em lagoas de estabilização e enfatizam que o gênero *Aeromonas* apresenta diferentes características adaptativas.

Sabe-se que nos processos de tratamento por lagoas de estabilização a radiação solar é um dos fatores determinantes do decaimento das contagens de microrganismos ao longo do sistema (BENCHOKROUN *et al.* 2003). O mesmo autor confirma a opinião de BOUSSAID *et al.* 1991; HASSANI *et al.* 1992; BAHLAOUI *et al.* 1997, discorrem que *Aeromonas* spp quando comparada com Coliformes Fecais é relativamente mais resistente no tratamento de esgotos. Fato observado no presente estudo.

MAALEJ *et al.* (2003) avaliaram o efeito da radiação solar sobre coliformes fecais e *Aeromonas* spp, os autores verificaram que esse fator contribuiu para eliminar 9,9% dos organismos do gênero *Aeromonas* e 20,1% das bactérias coliformes fecais, demonstrando então que *Aeromonas* spp foi novamente mais resistente à radiação solar do que os coliformes fecais dentro do sistema de tratamento de esgoto.

7.4 *Aeromonas* e variáveis abióticas

Vários fatores ambientais podem influenciar, direta ou indiretamente, na presença de organismos do gênero *Aeromonas* no ambiente aquático.

A temperatura da água, que esteve durante todo o experimento entre 23 e 32°C, apresentou-se dentro de um intervalo bastante propício ao desenvolvimento de *Aeromonas* spp.. Não indica, portanto, que esse possa ter sido um dos fatores que tenha influenciado de forma significativa na sua contagem. Estudos realizados em ambientes com variações mais bruscas de temperatura, como é o caso dos realizados no Marrocos (IMZILN *et al.* 1998) e França (MONFORT & BALEUX 1991), evidenciam mais claramente a influência da temperatura no decaimento de *Aeromonas* spp.

Estudos demonstram que a temperatura pode apresentar efeito direto sobre a atividade metabólica desses microrganismos. BAHLAOUI *et al.* (1997), no entanto, verificaram que a correlação de *Aeromonas* spp com a temperatura pode estar associada à alteração no tempo de detenção do sistema nas diferentes estações do ano.

Diversos estudos indicam que valores de pH compreendidos entre 5,5 e 9,0 não só favorecem a sobrevivência, como também a multiplicação de *Aeromonas* spp (MATTÉ 1996). No presente estudo foram registrados valores de pH entre 6,0 e 8,0, ao longo do sistema

de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização, indicando que este fator é favorável ao desenvolvimento desses organismos.

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO), com concentrações variando entre 98 e 552 mg/L na entrada da lagoa anaeróbia e de 43 a 96 mg/L, na saída da lagoa facultativa, bem como os sólidos suspensos totais (SST), com valores variando entre 150 e 340 mg/L na entrada da lagoa anaeróbia e entre 78 e 270 mg/L na saída da lagoa facultativa, são indicativos da elevada concentração de matéria orgânica existente, mesmo na saída do sistema de lagoas. Considerando-se que *Aeromonas* spp têm sua sobrevivência e multiplicação favorecidos pelo aumento do conteúdo de matéria orgânica, pode-se inferir que esse tenha sido um dos fatores que contribuíram para sua ocorrência, como observado também por BENCHOKROWN *et al.* (2003).

No atual estudo não foi observada correlação entre variáveis abióticas e a presença de *Aeromonas* spp. BENCHOKROWN *et al.* (2003), verificaram, no entanto, que os testes tradicionais de correlação podem não demonstrar a real relação entre a presença desse microrganismo e as variáveis abióticas, sendo necessário estudos estatísticos mais aprofundados.

Quando analisados em seu conjunto, a temperatura, pH, DBO e SST (Anexo III-B), denota-se a existência de condições ambientais extremamente propícias para a ocorrência e multiplicação de microrganismos do gênero *Aeromonas*, em todas as fases do sistema de lagoas de estabilização estudado. Essa observação é consistente com as

elevadas contagens de *Aeromonas* spp. observadas mesmo na saída da lagoa facultativa.

7.5 *Aeromonas* spp e sistema de desinfecção com cloro

O cloro é um poderoso agente desinfetante, amplamente utilizado em sistemas de esgotos municipais para eliminar organismos, bloqueando o processo enzimático bioquímico celular. É, portanto, um efetivo auxiliar no combate a variada gama de microrganismos, inclusive patógenos (VESCHETTI *et al.* 2003).

A desinfecção por cloro foi adicionada ao processo para proporcionar um polimento final ao efluente com vistas à aplicação no reúso agrícola. Os parâmetros estipulados para reúso de efluentes tratados são considerados apenas em termos de bactérias indicadoras de contaminação fecal, e ovos de helmintos (VESCHETTI *et al.* 2003).

Diversos estudos revelaram a resistência de organismos do gênero *Aeromonas* a cloração, e que esses organismos podem se multiplicar no reservatório de água tratada após a cloração (BURKE *et al.* 1984; PAYMENT *et al.* 1988; KIROV 1993; GAVRIEL *et al.* 1998; FALCÃO *et al.* 1998; RAZZOLINI 1998).

Os resultados obtidos, no presente estudo, revelaram que o sistema de desinfecção por cloro não foi capaz de eliminar 100% das *Aeromonas* do sistema. Foram observadas flutuações desses organismos

nas diferentes contagens quando comparados à da etapa anterior, ou seja, à saída da lagoa facultativa.

Em três situações pode-se verificar que as contagens não só demonstravam a presença de *Aeromonas* spp no sistema de desinfecção, mas, também, revelaram maiores contagens em relação à saída da lagoa facultativa (Tabelas 2 e 3).

Durante o período em estudo, ainda que as contagens de *Aeromonas* fossem inferiores às obtidas para *E. coli* foi observada uma menor remoção de *Aeromonas* do sistema (Figura 8).

Notou-se uma acentuada disponibilidade de nutrientes no sistema de lagoas e na unidade de desinfecção, conforme se verifica pelos elevados valores de nitrogênio e fósforo registrados (Tabela 2 do Anexo III - B). Este é outro fator que pode favorecer a sobrevivência de *Aeromonas* spp, como observado por autores como HASSANI *et al.* (1992); KERSTERS *et al.* (1996); MAALEJ *et al.* (2003); BENCHOKROWN *et al.* (2003).

Ainda, deve-se levar em conta que o sistema de lagoas e a própria unidade de desinfecção por cloro apresentaram elevadas concentrações de sólidos suspensos, influenciando na disponibilidade de cloro residual. Por outro lado, como assinalado anteriormente, é preciso reafirmar o fato de que o gênero *Aeromonas* é um organismo reconhecido por sua capacidade de resistência ao cloro.

Dentre as espécies identificadas, na unidade de cloração, foi observada a presença de espécies de *Aeromonas* consideradas

ambientais. Porém, *A. veronii sobria*, *A. trota* e *A. hydrophila* que são consideradas patogênicas para o homem, também estavam presentes.

POWER & NAGY (1999), avaliando um sistema de abastecimento de água em Sydney – Austrália, constataram que *A. hydrophila* foi mais freqüente, tanto na água bruta, quanto na tratada. Estes autores verificaram uma correlação positiva entre a turbidez e a presença de *A. hydrophila* e consideraram que esse fator pode ter influenciado na redução da eficiência da cloração, favorecendo as elevadas concentrações de *A. hydrophila* no sistema. Na saída facultativa (efluente) do presente do tratamento de esgoto foi possível observar também a presença de algas.

Quanto à resistência de *Aeromonas* spp ao hipoclorito de sódio e aos vários antibióticos, a bibliografia como mencionado na revisão de literatura, praticamente inexistente. Vale lembrar, no entanto, que as elevadas concentrações de drogas lançadas no ambiente (antibióticos, fertilizantes etc), normalmente nos processos de tratamento de esgotos, são insuficientes para a eliminação dessas bactérias. TERNES (1998) faz essa afirmação, e assinala que a presença de algumas espécies de *Aeromonas* podem ter sido favorecida. Este fato pode ter ocorrido no presente estudo, uma vez que somente algumas espécies foram evidenciadas ao final da desinfecção.

É importante lembrar que o processo de desinfecção analisado neste estudo se refere a um estudo de caso experimental, na qual as concentrações de cloro e tempo de contato foram diferentes, como relatado no item material e métodos (Anexo III - C). Esse fato impossibilitou

comparações mais precisas e análises mais acuradas, quanto ao comportamento de *Aeromonas* spp e o comportamento observado para *E. coli*, bem como sua sensibilidade ao processo de desinfecção.

FERNÁNDEZ *et al.* (2000) verificaram que a formação de biofilmes poderia explicar a persistência de patógenos Gram negativos, entre eles *A. hydrophila* em água de abastecimento.

Considerando a possibilidade de formação de biofilmes, em processos de lagoas de estabilização, esse fato poderia explicar a presença de *Aeromonas*, tanto no efluente final como na unidade de desinfecção. De fato, estudos realizados por GAVÍN *et al.* (2003) em amostras clínicas, alimentos e peixes mortos, demonstraram a capacidade de adesão de cepas de *Aeromonas* e relacionaram essa capacidade ao potencial de formação de biofilmes.

Estudos realizados por SISTI *et al.* (1998) avaliaram a ação do cloro sobre os isolados de *Aeromonas* em águas de abastecimento. Os autores observaram uma influência da temperatura sobre a eficácia da desinfecção por este agente. Os resultados observados em seu estudo foram contrários ao de alguns autores já citados; *Aeromonas* spp apresentaram-se mais susceptíveis do que *E. coli* à ação do cloro. Porém, convém ressaltar as temperaturas baixas registradas pelos pesquisadores, que foram entre 5 e 20°C. No presente estudo, foi observado que as temperaturas obtidas foram sempre superiores a 23°C sugerindo que este fator pode ter interferido na ação do cloro no sistema de desinfecção, favorecendo assim a manutenção de algumas espécies *Aeromonas*.

No mesmo estudo, SISTI *et al.* (1998) observam que, no caso das *Aeromonas* spp, a resistência ao cloro poderia estar associada à agregação de células para formação de biofilme; ou ainda a uma capacidade de encapsular de maneira atípica a de outros microrganismos. Os mesmos autores também estudaram a resistência aos antibióticos em *Aeromonas* verificando uma menor resistência no efluente final do que no esgoto bruto. Entretanto, observaram que *A. caviae*, foi mais sensível ao tratamento, enquanto ocorreu uma alta concentração de *A. sobria* tida como mais resistente a esse tratamento.

Como já mencionado, poucos estudos estão disponíveis referindo a presença de bactérias do gênero *Aeromonas* em águas de abastecimento que receberam tratamento por hipoclorito de sódio (HAVELAAR *et al.* 1992; KIROV 1993; GAVRIEL *et al.* 1996; RAZZOLINI 1998). De maneira geral, os autores demonstram a vulnerabilidade apresentada pelos sistemas de armazenamento de água tratada quanto à presença de *Aeromonas* e evidenciam que sua manutenção para a preservação da qualidade da água é fundamental (GAVRIEL *et al.* 1996).

Não foram encontrados trabalhos específicos que empregaram a desinfecção com cloro em pesquisa sobre *Aeromonas*, provenientes de amostras de esgoto, dificultando a comparação dos resultados obtidos no presente estudo frente aos achados de outros grupos de pesquisa sobre o tema.

7.6 Estudo do perfil plasmidial

Plasmídios são importantes determinantes de virulência em muitos enteropatógenos bacterianos, mas pouco se conhece sobre seu papel na virulência de *Aeromonas* spp (BAUAB 2000).

Considerando que os plasmídios podem codificar uma ampla variedade de determinantes genéticos, permitindo que seu hospedeiro sobreviva melhor em um ambiente adverso ou mesmo que este possa competir com outros organismos, esses elementos extracromossômicos podem representar uma via importante para o desenvolvimento de resistência em organismos do gênero *Aeromonas* (MATTÉ 1996; BROWN *et al.* 1997; KHACHATOURIANS 1998).

A presença de plasmídios nos isolados de *Aeromonas* provenientes do tanque de cloração, após tratamento do esgoto por lagoas de estabilização, revelou que 83,0% dos isolados apresentaram pelo menos um plasmídio, e demonstrou que estes elementos podem estar presentes em uma parcela significativa de cepas de *Aeromonas* que passam por este sistema de desinfecção.

As diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas no sistema de desinfecção e que apresentaram plasmídio foram *Aeromonas allossaccharophila*, *A. bestiarium*, *A. caviae*, *A. encheleia*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. trota*, e *A. veronii sobria*.

Na literatura pesquisada não foram observados estudos que avaliassem a presença de plasmídios em isolados de *Aeromonas* provenientes de sistema de tratamento de esgoto.

Um estudo comparando a presença de plasmídios em *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais e clínicas revelou que esses elementos são mais comuns em cepas de *A. sobria* ambientais do que clínicas (BROWN *et al.* 1997).

Investigando cepas ambientais de *Aeromonas* MIRANDA & CASTILLO (1998) observaram a incidência de plasmídios de resistência a antibióticos nesses organismos.

ARTURO-SCHAAN *et al.* também em (1996) utilizando o ácido peracético como desinfetante em lagoas de estabilização, notaram que não houve uma redução na proporção de cepas de *E. coli* que continham plasmídios, mesmo após a aplicação deste desinfetante.

Em um estudo investigando indicadores microbiológicos em sistemas de tratamento de águas residuárias, na cidade do México, FIGUEROA *et al.* (2003) sugerem que os genes de resistência são mediados por plasmídios que podem ser transferidos para outras bactérias patogênicas.

A presença desses elementos extracromossômicos nas cepas de *Aeromonas* estudadas, pode sugerir que independente do destino dado ao efluente estudado, este pode representar não só uma fonte de organismos potencialmente patogênicos, como é o caso de *Aeromonas*, mas também uma fonte de organismos aptos a transferir fatores de resistência e

capacidades adaptativas aos demais microrganismos presentes no ambiente receptor desse efluente.

KHACHATOURIANS *et al.* 1998 demonstram as implicações na agricultura da transferência de bactérias resistentes a antibióticos, as conseqüências ao ambiente, à cadeia alimentar e à saúde humana, salientam ainda a importância da transferência de resistência entre espécies no ambiente.

De fato, em estudo avaliando o impacto dos efluentes lançados em corpos d'água sobre a resistência de microrganismos a antibióticos, URRIZA *et al.* 2000 concluíram que estes lançamentos aumentaram de uma forma geral a resistência de cepas de bactérias tanto autóctones como alóctones.

No sistema de tratamento de esgoto são coletados resíduos provenientes de esgotamento doméstico, bem como de fontes hospitalares, formando, portanto, um ambiente (lagoa de estabilização) onde existe a possibilidade de interação entre organismos resistentes e não resistentes a antibióticos e outros fatores, bem como portadores e não portadores de fatores de virulência. Fato amplamente discutido por MATTÉ (1996) na qual sugere que estes organismos podem transferir ou receber plasmídios de resistência a antibióticos ou ainda para a produção de fatores de virulência, e assim passarem a apresentar este potencial.

7.7. Aspectos do reúso de águas residuárias

A compreensão da dinâmica de organismos patogênicos nos sistemas de tratamento de águas residuárias com o potencial de reúso reveste-se de especial importância, devido ao elevado risco que representa. Um contingente populacional expressivo poderá sofrer as consequências caso esse processo ocorra de forma não apropriada do ponto de vista tecnológico, o que deve ser garantido pelas autoridades sanitárias.

A pesquisa de *Aeromonas* demonstrou que estes organismos estão presentes no efluente final do sistema de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização, e que podem resistir ao processo de desinfecção por cloro destes efluentes.

Assim como observado por outros pesquisadores, esses organismos podem ser selecionados ao longo do sistema, favorecendo aqueles possuidores de fatores de resistência como, por exemplo, os plasmídios (ARTURO-SCHAAN *et al.* 1996).

A relação entre a produção de doença e a utilização de água de reúso tem sido claramente demonstrada em estudos epidemiológicos (CIFUENTES *et al.* 1994; CIFUENTES 1998; BLUMENTHAL *et al.* 2001).

No México, em 1994, em um estudo de caso controle, foram comparadas três comunidades de agricultores, sendo duas que utilizavam água de reúso e uma, incluída como controle, que utilizava água reconhecidamente não poluída para irrigação de suas culturas. Os autores

observaram uma maior freqüência de doenças diarréicas nos indivíduos das comunidades que utilizaram água de reúso que na comunidade controle (CIFUENTES *et al.*1994).

Um segundo estudo, realizado no México, CIFUENTES (1998), demonstrou um maior risco de apresentar doença diarréica em indivíduos pertencentes a famílias que utilizavam esgoto não tratado para irrigação de culturas. O autor não observou diferença no risco de adquirir doença em indivíduos que utilizavam esgoto tratado, quando comparado ao grupo controle, porém ressalta que as contagens de ovos de helmintos no efluente do sistema estudado eram nulas.

Semelhantes resultados foram observados por BLUMENTHAL *et al.* 2001 em outro estudo epidemiológico realizado no México.

No momento da criação de normas, as autoridades sanitárias necessitam ter como referência trabalhos científicos que avaliem o risco potencial que um determinado processo apresenta para a saúde da população. Deve-se ressaltar, ainda que a legislação brasileira não estabelece padrões de qualidade microbiológica em relação ao reúso de água para aplicação na agricultura. Entretanto, no Brasil os setores de meio ambiente utilizam índices propostos pela OMS (1989).

No caso do reúso de águas residuárias, onde especialmente no Brasil, os estudos realizados são ainda escassos para determinar o real risco a que estaria sujeita a população. Vale lembrar a possibilidade da aplicação do princípio da precaução, como sendo a garantia

contra os riscos potenciais que, de acordo com o estado atual do conhecimento, não podem ainda ser identificados (DALLARI & VENTURA 2002; GOLDSTEIN 2001). Assim como constatado neste e em outros estudos, a presença de *Aeromonas*, nesses ambientes representa um risco ainda não adequadamente estabelecido.

Atualmente as águas residuárias, na prática diária, acabam sendo submetidas ao reúso indireto, ou seja, esgotos não tratados ou tratados por diversos sistemas, são lançados nos corpos d'água, sendo utilizados pelas comunidades situadas a jusante para diversos fins, inclusive para o uso doméstico ou na agricultura.

Considerando que a “Environmental Protection Agency” dos Estados Unidos (EPA), no ano de 2000, recomendou a pesquisa de *A. hydrophila* como parâmetro para qualidade de água de abastecimento; que existe uma elevada concentração desses organismos no efluente final de um sistema de lagoas de estabilização; que esse grupo de bactérias pode ter sido selecionado quanto à resistência pelo sistema de tratamento; e que esse efluente é normalmente lançado nos corpos d'água, o reúso indireto, possibilitará uma maior ocorrência de cepas resistentes aos tratamentos subsequentes que esta água possa sofrer.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e na análise da literatura foi possível concluir que:

- ✓ Os organismos pertencentes ao gênero *Aeromonas* estão presentes nas diversas fases do sistema de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização;
- ✓ As contagens de *Aeromonas* no sistema demonstraram a dificuldade do estabelecimento de padrões para estes organismos no ambiente estudado;
- ✓ A espécie *Aeromonas caviae* foi predominante na entrada do sistema, porém existe diferenciação desse predomínio no decorrer do tratamento;
- ✓ Os indicadores de contaminação fecal e indicadores de eficiência sanitária não apresentaram correlação com a presença de *Aeromonas*;
- ✓ Foi verificada a presença de pelo menos um plasmídeo nas cepas isoladas na unidade de cloração.
- ✓ O risco associado à presença de *Aeromonas* provenientes do sistema de lagoas de estabilização, existe principalmente em decorrência do lançamento desses efluentes no meio ambiente aquático e sua eventual reutilização, de forma direta ou indireta como fonte de água.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo vem contribuir para o conhecimento desse complexo grupo de microrganismos que compõe o gênero *Aeromonas*, anteriormente reconhecido como patógeno oportunista, mas que diante de vários estudos realizados nos últimos anos, vem se destacando como um patógeno emergente, indicando a necessidade de atenção por parte das autoridades de saúde pública e vigilância sanitária.

Os resultados desta pesquisa servem como um alerta para as Companhias de Saneamento, de que outros patógenos podem ser encontrados e investigados nos efluentes analisados, sendo que *Aeromonas* spp pode ser citada com um desses exemplos.

Portanto, ressalta-se a necessidade da realização de maiores investigações, de ordem prática, a respeito da qualidade sanitária de esgotos com potencial de reúso na irrigação agrícola, principalmente em países como o Brasil.

10. REFERÊNCIAS*

Abbott SL, Wendy KWC, Janda JM. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. **J Clin Microbiol** 2003; 41 (6):2348-57.

Abdullah AI, Hart CA, Winstanley C. Molecular characterization and distribution of virulence-associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. **J Appl Microbiol** 2003; 95:1001-7.

Allen DA, Austin B, Colwell RR. *Aeromonas media* a new species isolated from river water. **Int J Syst Bacteriol** 1983; 33: 599-604.

Ali A, Carnahan AM, Altwegg M, Lüthy-Hottenstein J, Joseph J. *Aeromonas bestiarium* sp nov. (formely genospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. **Med Microbio Let** 1996; 5:156-165.

Altwegg M, Geiss HK *Aeromonas* as an human pathogen. **Crit Vet Microbiol** 1999;16: 253-86.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed., APHA. AWWA, WEF, Washington, 1995.

* De acordo com guia de teses da biblioteca da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Araújo RM, Arribas RM, Lucena F, Pares R. Relation between *Aeromonas* and fecal coliforms in fresh waters. **J Appl Bacteriol** 1989; 67:213-7.

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

Arturo-Schaan M, Sauvager F, Mamez C, Gougeon A, Cormier M. Use of Peracetic Acid as a Disinfectant in a Water-Treatment Plant: Effect on the Plasmid Contents of *Escherichia coli* Strains. **Current Microbiol** 1996; 32:43-7.

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** 1995; 31 (5-6):263-9.

Bahlaoui MA, Baleux B, Troussellier M. Dynamics of pollution indicator and pathogenic bacteria in high-rate oxidation wastewater treatment ponds. **Wat Res** 1997; 31 (3):630-8.

Bahri A. Agricultural reuse of wastewater and global water management. **Wat Sci Tech** 1999; 40 (4-5): 339-46.

Bauab TM. ***Aeromonas* 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].

Benchokroun S, Imziln B, Hassani L. Solar inactivation of mesophilic *Aeromonas* by exogenous photooxidation in high-rate algal pond treating waste water. **J Appl Microbiol** 2003; 94: 531-9.

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

Bonadonna L, Briancesco R, Ciccozzi M, Filetici E, Manuppella A, Pourshaban M, Semproni M, Shimada T. Biotyping, serotyping and genotyping of aeromonads from environmental and clinical samples. **W J Microbiol Biotech** 2001; 17: 673-6.

Born RH. **Aspectos conceituais, ambientais e de saúde pública do aproveitamento (re-uso) de águas residuárias no solo como instrumento da administração da Qualidade Ambiental.** [Dissertação de Mestrado], 1991 - FSP/Departamento de Saúde Ambiental/USP.

Borrel N, Figueras MJ, Guarro J. Phenotypic identification of *Aeromonas* genospecies from clinical and environmental sources. **Can J Microbiol** 1998; 44:103-8.

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

Brandi G, Sisti M, Schiavano GF, Salvaggio L, Albano A. Survival of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. **J Appl Bacteriol** 1996; 81: 439-44.

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

Blumenthal UJ, Cifuentes E, Bennett S, Quiley M, Ruiz-Palacios G. The risk of enteric infections associated with wastewater reuse: the effect of season and degree of storage of wastewater. **Trans Royal Soc Tropical Med Hig** 2001; (95):131-7.

Bulhões CCC, Rossi Júnior OD. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arq Bra Med Vet Zootec.** 2002; 54 (3):320-324.

Burke V, Robinson J, Gracey M, Peterson D, Meyer N, Haley V. Isolation of *Aeromonas* spp from an unchlorinated domestic water supply. **Appl Environ Microbiol.** 1984; 48(2):367-370.

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

Carnahan AM, Behram S, Joseph SW. Aerokey II. A flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. **J Clin Microbiol** 1991 b 29 (12): 2843-9.

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** 1999; 86: 906-16.

CETESB. Guia e orientação e preservação de amostras de água. São Paulo, 1986.

Cheng NC, Horng SY, Chang SC, Tang YB. Nosocomial infection of *Aeromonas hydrophila* presenting as necrotizing fasciitis. **J Forms Med Assoc** 2004, 103 (1):53-7.

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

Cifuentes E, Blumenthal U, Ruiz-Palacios G, Bennett S, Peasey A. Escenario epidemiológico del uso agrícola del agua residual: El Valle del Mezquital, México. **Salud Pub Mex** 1994; 36:3-9.

Cifuentes E. The epidemiology of enteric infections in agricultural communities exposed to wastewater irrigation: perspectives for risk control. **Intern J Environ Health Res** 1998; (8):203-13.

Colwell RR, Macdonell MT, Deley J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. Nov. **Int J Syst Bacteriol** 1986; 36(3): 473-7.

Coway DJ, Roper C. Micro-evolution and emergence of pathogens. **Int J Parasit** 2000; 30: 1423-30.

Crook J, Surampalli RY. Water reclamation and reuse criteria in the U.S. **Wat Sci Tech** 1996; 33 (10-11):451-62.

Dallari G, Ventura DFL. "O Princípio da Precaução dever do Estado ou Protecionismo disfarçado"? **São Paulo em Perspectiva** 2002; 16(2):53-63.

Dorsch M, Ashbolt NJ, Cox PT, Goodman AE. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers. A molecular approach based on screening of environmental isolates. **J Appl. Bacteriol** 1994; 77:722-6.

Emmerson AM. Emerging Waterborne Infections in Health-Care Settings. **Emerg Infect Dis**; 2001; 7 (2):272-6.

Esteve C, Gutiérrez MC, Ventosa A. *Aeromonas encheleia* sp nov., isolated from European eels. **Int J Syst Bacteriol**; 1995; 45 (3): 462-6.

Esteve C, Valera L, Gutiérrez C, Ventosa A. Taxonomic study of sucrose-positive *Aeromonas jandaei*-like isolates from faeces, water and eels: emendation of *A. jandaei* Carnahan *et al.* 1992. **Int J Syst Evolut Microbiol** 2003; 53: 1411-9.

Falcão DP, Lustri WR, Bauab TM. Incidence of Non-01 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp in fresh water in Araraquara, Brazil. **Current Microbiol** 1998; 37:28-31.

Fernández 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** 2000; 108:35-40.

Figueroa LAJ, Sánchez JS, Salas FJU, García EC. Microbiological indicators of water quality in the Xochimilco canals, México City. **Salud Pub Mex** 2003; 45 (5):389-95.

Funada H, Matsuda T. *Aeromonas* bacteremia in patients with hematologic diseases. **Intern Med** 1997; 36:171-4.

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** 1996; 13:369-74.

Garrit GM, Winters M, Searles DB. Taxonomic outline of the procaryotic genera Bergey's manual of systematic bacteriology [document on line]. Bergey's manual trust. 2nd ed. Version 4.01. New York: Springers-Verlag; 2001. Available from <URL: <http://www.cme.msu.edu/bergeys/april/2001-genus.pdf>>.[2004 fev 26].

Gavín R, Rabaan AA, Merino S, Tomás JM, Gryllos I, Shaw JG. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Mol Microbiol** 2002; 43 (2):383-97.

Gavín R, Merino S, Altarriba M, Canals R, Shaw JG, Tomás JM. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. **FEMS Microbiol Let** 2003; (224): 77-83.

Gavriel AA, Landre JPB, Lamb AJ. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. **J Appl Microbiol** 1998; 84:383-92.

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** 2000; 89:70-5.

Goldstein BD. The Precautionary principle also applies to Public Health Actions. **Amer J Public Health**. 2001; 9 (9).

Granum EP, O'Sullivan K, Tomás JM, Ormen O. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp from food and water. **FEMS Immunol Med Microbiol** 1998; 21:131-7.

Harf-Monteil C, Flèche AL, Riegel P, Prévost G, Bermond D, Grimont PAD, Monteil H. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. **Inter J Syst Evolut Microbiol** 2004; 54:481-5.

Hassani L, Imzilin 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** 1992; 23:227-37.

Havelaar AH, Schets FM, Silfhoutvan A, Jansen WH, Wieten G, Kooijvander D. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. **J Appl Bacteriol** 1992; 72: 435-44.

Hespanhol I. "Saúde Pública e Reúso Agrícola de Esgotos e Biossólidos" In: Reúso de Água. 1ª edição São Paulo: Manole/USP, 2003. p.97.

Hickman-Brenner FW, Mac Donald 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** 1987; 25 (5):900-6.

Hickman-Brenner FW., Fanning GR., Arduino MJ., Brenner DJ., Farmer III JJ. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. **J Clin Microbiol**. 1988; 26(8):1561-4.

Hirotsu 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** 1999, 71(2):132-8.

Hokama A, Kinjo F, Saito A. Endotoxin in *Aeromonas sobria* infection: speculative pathogenesis and treatment strategies in advanced liver disease with soft-tissue infection. **Am J Gastroent** 1996; 91:1475.

Husslein V, Bergbauer H, Chakraborty T. Studies on aerolysin and serine protease from *Aeromonas trota* sp. Nov. **Experientia**. 1992; 47:420-42.

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

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 description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 (Approved Lists 1980). **Int J Syst Evolut Microbiol** 2002; 52:705-12.

Huys G, Pearson M, Kämpfer P, Denys R, Cnockaert M, Inglis V, Swings J. *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicemic farmed frogs in Thailand. **Int J Syst Evolut Microbiol** 2003; 53:885-91.

IBGE. Censo demográfico: resultados do Estado de São Paulo – Cidade (10º recenseamento geral do Brasil). Disponível em [URL:http://www.ibge.gov.br/](http://www.ibge.gov.br/) [20/03/2002].

Imzilin B, Krovacek K, Baloda BS, Kuhn I, Rey CG, Svenson SB. Characterisation of potencial virulence markers in *Aeromonas caviae* isolated from polluted and unpolluted aquatic environments in Morocco. **FEMS Microbiol Ecol** 1998; 27:153-61.

Itoh H, Kuwata G, Tateyama S, Yasmashia 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 Inter** 1999; 49:541-6.

Ivanova EP, Zhukova NV, Gorshkova NM, Chaikina EL. Characterization of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from drinking water reservoir. **J Appl Microbiol** 2001; 90:919-27.

Janda JM, Duffley PS. Mesophilic Aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification and infectious disease spectrum. **Rev Infect Disease** 1988; 10 (5):980-7.

Janda JM, Abbott SL. Human Pathogens. In: Austin B, Altwegg M, Gosling PL, Joseph S. (Ed.). The Genus *Aeromonas*. **Chichester: J. Willey e Sons.** 1996; 151-73.

Janda JM, Abbott SL. Evolving Concepts Regarding the Genus *Aeromonas*: An Expanding Panorama of Species, Disease Presentations, and Unanswered Questions. **Clin Infect Dis** 1998; 27:332-44.

Joseph SW, Carnahan A, Rollins D, Walker RI. *Aeromonas* and *Plesiomonas* in the environment: value of differential biotyping of Aeromonads. **J Diarr Dis Res** 1988; 6 (2):80-7.

Joseph SW, Carnahan A, Brawyton PR, Fanning GR, Almazan R, Drabick C, Trudo JR EW, Colweel, RR. *A. jandaei* and *A. veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. **J Clin Microbiol** 1991; 29 (3):563-9.

Joseph SW, Carnahan AM. Update on the Genus *Aeromonas*. **ASM News**. 2000; 66 (4):218-21.

Kamano Y, Ohashi H, Kikuchi T, Watanabe K, Kitahara M. Liver abscess and *Aeromonas* bacteremia with septic pulmonary embolism. **Intern Med** 2003; 42 (10):1047-9.

Katzenelson E, Buium I, Shuval H. Risk of communicable disease infection associated with wastewater irrigation in agricultural settlements. **Science** 1976; 194 (4268):944-6.

Kaznowski A. Identification of *Aeromonas* strains of different origin to the genomic species level. **J Appl Microbiol** 1998; 84:423-30.

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

Khachotourians GG. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **Can Medic Assoc** 1998; 3 (159): 1129-36.

Khadori N, Fainstein V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. **Ann Rev Microbiol** 1988; 42:395-419.

Khashe S, Warren H, Janda JM. Charaterization of *Aeromonas hydrophila* Strains of Clinical, Animal, and Environmental Origin Expressing the O:34 Antigen. **Current Microbiol** 1996; 33:104-8.

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

Ko WC, Chang YC. *Aeromonas* bacteremia: Rewiew of 59 episodes. **Clin Infect Dis** 1995; 20:1298-304.

Kohashi T, Sakai H, Marumo F, Sato C. *Aeromonas sobria* infection with severe muscle degeneration in a patient with alcoholic liver cirrhosis. **Am J Gastroent** 1995; 90: 2234-5.

Kuhn I, Albert MJ; Anzaruzzaman M; Bhniyan NA; Alabi SA; Islam MS; Neogi PKB; Huys G, Janssen P, Kerters K, Mollby R. Characterization of *Aeromonas* spp isolated from humans with diarrhea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. **J Clin Microbiol** 1997; Fev: 369-73.

Kuhn I, Allestam, G, Huys G, Janssen P, Kerters K, Krovacek K, Sternstrom TA. Diversity, Persistence and Virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. **Appl Environ Microbiol** 1997; July: 2708-15.

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

Martinez-Murcia AJ, Esteve C, Guaray E, Collins MD. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. **FEMS Microbiol Let** 1992; 91:99-206.

Martino R, Santamaria A, Pericas R, Sureda A. Brunet S. Acute rhabdomyolysis and myonecrosis complicating *aeromonas* bacteremia in neutropenic patients with hematologic malignancies: report of two cases. **Haematologica** 1997; 82:692-694.

Martins LM, Marquez RF, Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2002; 32: 237-42.

Massa S, Altieri C, D'Angela A. The occurrence of *Aeromonas* spp in natural mineral water and well water. **Int J Food Microbiol** 2001; 63:169-73.

Matté MH. **Pesquisa de *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas em alguns pontos da Represa do Guarapiranga destinados à recreação e captação para abastecimento público.** São Paulo – SP. 1995 [Dissertação de Mestrado].

Matté MH, Nitrini SMOO, Matté GR. *Aeromonas* relacionadas com infecções no homem: aspectos epidemiológicos, ecológicos, laboratoriais, de virulência e relativos à saúde pública. **Laes & Haes**, 1996; 104:62-74.

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

McMahon MAS, Wilson IG. The occurrence of enteric pathogens na *Aeromonas* species in organic vegetables. **Int J Food Microbiol** 2001; 70: 155-62.

Merino S, Rubires X, Knochel S, Tomás MJ. Emerging Pathogens: *Aeromonas* spp. **Int J Food Microbiol** 1995; 28:157-68.

Messi P, Guerrieri E, Bondi M. Survival of na *Aeromonas hydrophila* in an artificial mineral water microcosm. **Wat Res** 2002; 36:3410-5.

Minnaganti RV, Patel PJ, Iancu D, Schoch PE, Cunha AB. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila*. **Heart & Lung** 2000; 29(4):306-8.

Miranda CD, Castillo G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **Sci Total Environm** 1998; 224:167-76.

Monfort P, Baleux B. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. **Appl Environm Microbiol** 1990; July:1999-2006.

Monfort P, Baleux B. Distribution and Survival of motile *Aeromonas* spp in Brackish water receiving sewage treatment effluent. **Appl Environm Microbiol** 1991; Sept: 2459-67.

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** 1993; 168:215-8.

Nayduch D, Honko A, Noblet GP, Stutzenberger F. Detection of *Aeromonas caviae* in the common housefly *Musca domestica* by culture and polymerase chain reaction. **Epid Infect** 2001; 127: 561-6.

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

Nsabimana E, Belan A, Bohatier J. Analysis at the genomospecies level of microbial populations changes in activated sludge: The case of *Aeromonas*. **Wat Res** 1999; 34 (5): 1696-704.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diretrizes sanitarias sobre el uso de aguas residuales en agricultura y acuicultura. Serie de informes técnicos 778, 1989, Genebra, Suíça.

Ouderkirk JP, David B, Turett GS, Murali R. *Aeromonas* Meningitis Complicating Medicinal Leech Therapy. **Clin Infect Dis** 2003; 38:36-7.

Palumbo SA, Maxino F, Willian SAC, Buchanan RL, Thayer DW. Starch-Ampicillin Agar for the Quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. **Appl. Envir Microbiol** 1985; 50 (4):1027-30.

Park TS, Oh SH, Lee EY, Lee TK, Park KH, Figueras MJ, Chang CL. Misidentification of *Aeromonas veronii sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. **Lett Appl Microbiol** 2003; 37 (4):349-53.

Parodi SG, Peso OA. Investigación de *Aeromonas* (móviles) en líquido cloacal de la ciudad de Buenos Aires y agua del Rio de la Plata. **Rev Argent Microbiol** 1983; 15 (1):33-9.

Pavan ME, Abbott SL, Zorzópolos J, Janda JM. *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river. **Int J Syst Evolut Microbiol** 2000; 50: 1119-24.

Pavlov D, De Wet CME, Grabow WOK, Ehlers MM. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. **Int J Food Microbiol** 2003; Article in Press.

Payment P, Gamachc F, Paquette G. Microbiological and virological analysis of water from two water filtration plants and their distribution systems. **Can J Microbiol** 1988; 34 (12):1304-9.

Pianetti A, Baffone W, Bruscolini F, Barbieri E, Biffi MR, Salvaggio L, Albano A. Presence of several pathogenic bacteria in the Metauro and Flogia Rivers (Pesaro-Urbino, Italy). **Wat Res** 1998; 32 (5):1515-21.

Pianetti A, Sabatini L, Bruscolini F, Chiaverini F, Cecchetti G. Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for the irrigation of agricultural products. **Epidemiol Infect** 2004; 132: 231-8.

Pidiyar V, Kasnowski A, Narayan NB, Patole M, Shouche YS. *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. **Int J Syst Evolut Microbiol** 2002; 32:1723-8.

Pinna A, Sechi LA, Zanetti S, Usai D, Carta F. *Aeromonas caviae* Keratitis Associated with Contact Lens Wear. **Ophthalmology** 2004; 111:348-51.

Popoff M, Murray RGE, Brenner DJ, Bryant MT, Holt JG, Krieg NR, Moulder JW, Pfnig N, Sneath PHA, Staley JT. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. *Aeromonas* in: Baltimore/London, **Wilians & Wilkins**, 1984;1:545-8.

Power KN, Nagy LA. Relationship Between Bacterial Regrowth and Some Physical and Chemical Parameters Within Sydney's Drinking Water Distribution System. **Wat Res** 1999; 33(3):741-50.

Radu S, Ahmad N, Ling FH, Reezal A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **Int J Food Microbiol** 2003; 81:261-6.

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].

Razzolini MTP. **Avaliação Sanitária de Águas Residuárias provenientes de lagoas de estabilização para irrigação de culturas agrícolas no**

Estado de São Paulo. São Paulo. 2003.[Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública – USP].

Rippey SR, Cabelli VJ. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in limnetic environments: Relationship of the organism to trophic state. **Microb Ecol** 1980; 6:45-54.

Rippey SR, Cabelli VJ. Growth characteristics of *Aeromonas hydrophila* in limnetic waters of varying trophic state. **Arch Hydrobiol** 1985; 104(3):311-9.

Rossi Júnior OD, Nader Filho A, Amaral LA, Iturrino RPS. Isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas* da superfície das mãos de manipuladores da carne bovina, em Matadouro-Frigorífico do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar** 2000; 14 (78-79)90-4.

Santos HF e Mancuso PCS. "A Escassez e o Reúso de Água em Âmbito Mundial" In: Reúso de Água. 1ª edição São Paulo: Manole/USP, 2003. p. 1.

Sarma PS. *Aeromonas jandaeii* cellulitis and bacteremia in a man with diabetes. **Amer J Med** 2002; 112 (4):325.

Schubert RHW. Genus II. *Aeromonas*. In: Krieg NR, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: **Willians & Wilkins** 1974; 1: 345-8.

Schubert RHW, Hegazi M. *Aeromonas eucrenophila* species nova
Aeromonas caviae a latter and illegitimate synonym of *Aeromonas puntacta*.

Zentralbl Bakteriol Hyg 1988; A. 268: 34-9.

Scoglio ME, Di Pietro A, Picerno I, Mauro A, Lagana P. Virulence factors in
Vibrios and Aeromonads isolated from seafood. **Microbiologica** 2001; 24:
273-80.

Shiina Y, Li K, Iwanaga M. An *Aeromonas veronii* biovar *sobria* infection with
disseminated intravascular gas production. **J Infect Chemother** 2004; 10:
37-41.

Shiklomanov I. World Water Resources: A New Appraisal and Assessment
for the 21st Century. **IHP UNESCO** 1998; 32 p.

Shuval H, Adin A, Fattal B, Rawitz E, Perez Y. Integrated resource recovery
wastewater irrigation in developing countries. **Word Bank Techn** 1986; 51
Washington, 324 p.

Singh DV, Sanyal SC. Biochemical characteristics and enterotoxicity of
Aeromonas species from man and environmental. **J Diarrh Dis Res** 1992; 10
(4):231-4.

Sisti M, Alabano A, Brandi G. Bactericidal effect of chlorine on motile
Aeromonas spp in drinking water supplies and influence of temperature on
disinfection efficacy. **Let Appl Microbiol** 1998; 26:347-35.

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 freshwater and seawater. **FEMS Immunol Medic Microbiol** 2002; 32:243-7.

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

Smoot LM, Pearson MD. Indicator microorganisms and microbiological criteria. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food Microbiology, fundamentals and frontiers. Washington: **ASM Press** 1997: 66-80.

Tateyama S, Miyaguni H, Tsumori S, Era K, Okata K. Three fatal cases of soft tissue infection with *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, respectively in patients with liver cirrhosis. **Nishinilon Hifuka**. 1998; 60:653-9.

Ternes TA. Occurrence of Drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Wat Res** 1998; 32 (11):3245-60.

Urriza MG, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Appl Environm Microbiol** 2000(a); 66(1):125-32.

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

United States Environmental Protection Agency for International development Guidelines for Water Reuse. Washington DC. USA, 1992.

United States Environmental Protection Agency. United States Environmental Protection Agency proposes amendments to the Unregulated contaminant monitoring regulations under the safe drinking water act. March, 2002.

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

Vally H, Whittle A, Cameron S, Dowse GK, Watson T. Outbreak of *Aeromonas hydrophila* Wound Infections Associated with Mud Football. **Clin Infect Dis** 2004;38 (8):1084-9.

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. **Emerg Infect Dis** 2003; 9(5):552-5.

Villari P, Crispino P, Montuori P, Stanzione S. Prevalence and molecular characterization of *Aeromonas* spp in ready-to-eat foods in Italy. **J Food Prot** 2000; 63: (12)1754-7.

Villari P, Crispino M, Montuori P, Boccia S. Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. **Appl Environm Microbiol** 2003; 69 (1): 697-701.

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** 2002; 76:165-8.

WHO – World Health Organization. Meeting of Experts on Reuse of Effluents: Methods of Waste Water Treatment and Health Safeguards, Geneva, 1971.

GLOSSÁRIO

GLOSSÁRIO

Bacilos: forma bacteriana, bastonetes

Bacteremia: presença de bactérias circulantes no sangue

β-Hemólise: hemólise total, efeito da lise total das hemácias, produzindo uma zona clara, transparente, circundando a colônia.

Biogrupo: diferenciação de espécies baseadas em características metabólicas, através da utilização de diferentes substratos.

Cepa: todos os descendentes de uma colônia pura.

Cocos: forma bacteriana arredondada.

Coliformes: grupo bacteriano Gram-negativo, que fermenta a lactose com produção de ácidos e gases.

Entérica: relativo ao intestino.

Enterite: inflamação no intestino.

Enterobactéria: bactéria do trato gastrointestinal.

Enteropatogênica; enterotoxigênica: uma das seis classes patogênicas, nas quais as bactérias *Escherichia coli* estão agrupadas, cepas de *E. coli* ETEC.

Enterotoxinas: toxinas que afetam o equilíbrio eletrólito da mucosa intestinal.

Enzima hemolítica: enzimas que agem sobre os eritrócitos.

Enzimas proteolíticas: enzimas que agem sobre as proteínas.

Esporo: estrutura bacteriana, ligada à defesa bacteriana (resistência).

Fenoespécie: diferenciação de espécies, baseada em características do fenótipo.

Fenotípico: característica de um indivíduo, determinada pelo seu genótipo e pelas condições ambientais.

Genoespécie: diferenciação de espécies, baseada na relação citosina-guanina, que compõe o DNA.

Gram-negativo: que não retém o cristal violeta e se cora com a fucsina ou safranina.

Hemolítica: que lisa (quebra) as células do sangue.

Hibridização: processo de produzir híbridos, isto é, produto de cepas geneticamente diferentes

kb: kilobase (unidade usada para expressar peso)

Mesófilo: bactéria que cresce melhor em uma faixa moderada de temperatura (entre 25° C e 40° C).

Patógenas: que causam patogenicidade, doenças.

Patogenicidade: doenças.

Patógeno: o agente da doença.

Patógeno emergente: Termo que se refere ao um microrganismo, seja bactéria, vírus, fungo ou príon (a proteína que causa o mal da vaca louca) e que esteja causando uma doença na população com aumento na ocorrência de casos. Pode ser uma doença nova causada por um patógeno desconhecido ou um microrganismo conhecido que não estava em evidência e passa a causar um número maior de casos.

Patógenos entéricos: que causam doenças no intestino.

Plasmídeo: estrutura bacteriana com fragmento de DNA de fita dupla, que replica independente do cromossomo, geralmente chamado de fator F.

Septicemia: infecção generalizada.

Taxonomia: classificação (arranjo), nomenclatura (denominação) e identificação de organismos.

Virulência: grau de patogenicidade, exibido por cepas de microrganismos.

ANEXOS

ANEXO I

Meios de Cultura e Reagentes utilizados para isolamento de *Aeromonas* spp

Água peptonada alcalina 1%

Fórmula

1grama – peptona bacteriológica

1grama – Cloreto de sódio

100 mL – água destilada

Preparo

Foram dissolvidos os componentes na água destilada e o pH corrigido para 8,6 com NaOH 1N. Efetuou-se a autoclavação a 121° C por 15 minutos.

Preparo da solução salina

Fórmula

8,5 gramas de Cloreto de sódio

1000 mL – água destilada

Preparo

A solução foi distribuída, em frascos, em volume de 90 mL, e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Ágar Sangue Ampicilina – ASA

Fórmula

34 gramas de Müller Hinton

1000 mL – água destilada

Preparo

Após a dissolução da base de Müller Hinton em água destilada. Efetuou-se a autoclavação, para a esterilização, a temperatura do meio foi baixada até cerca de 50°C, adicionados assepticamente, 2,5% de sangue desfribinado e 50 µL/L de ampicilina para, após homogeneização, distribuição em placas.

Ágar Amido

Fórmula

5 gramas - Triptona bacteriológica

5 gramas - Peptona bacteriológica

5 gramas - Cloreto de sódio

3,5 mL - Vermelho de fenol

10 gramas - Amido

15 gramas – Agar

1000 mL - Água destilada

Preparo

Os reagentes foram dissolvidos em frascos com capacidade de 1000 mL e, aquecidos até completa dissolução, o pH corrigido para 7,4 com NaOH 1N. A esterilização foi efetuada em autoclave a 121°C por 15 minutos. A temperatura do meio foi baixada cerca de 50°C, para distribuição em placas.

Ágar MacConkey

51,5 g – Ágar MacConkey

1000 mL – água destilada

Preparo

O reagentes foi dissolvido em frasco com capacidade de 1000 mL. A esterilização foi efetuada em autoclave a 121°C por 15 minutos. A temperatura do meio foi baixada cerca de 50°C, para distribuição em placas.

Agar Ferro de Kligler (DIFCO)

Fórmula

54 gramas – Agar Ferro Kligler

1000 mL – água destilada

Preparo

O Ágar foi dissolvido na água destilada, aquecido até dissolução do meio, e distribuídos 2,5 ou 3 mL por tubos. Os tubos foram tampados e, autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos foram inclinados para formação de um ápice.

Ágar Lúria (ágar conservação)

Fórmula

1 grama - Triptona

0,4 grama - Extrato de levedura

1 grama - Cloreto de Sódio

0,5 grama - Ágar

100 mL - água destilada

Preparo

Foram dissolvidos todos os reagentes na água destilada, o meio foi aquecido para completa dissolução do ágar, sem atingir a temperatura de ebulição, e transferidos, assepticamente, 5 mL para tubos tipo “ependorf” estéreis.

Caldo Lúria

1 grama - Triptona

0,4 grama - Extrato de Levedura

1 grama - NaCl

100 mL - água destilada

Preparo

Foram dissolvidos todos os reagentes na água destilada, e distribuídos 2,0 mL por tubos. Os tubos foram tampados e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

ANEXO II

Reagentes para extração de plasmídios

Solução I (solução de lise)

Fórmula

4 mg/L – Lisozina

2% - Glicose

10 nM – EDTA

25 nM – Tris-HCl (pH=8,0)

Solução II

Fórmula

0,2 N – NaOH

1,0% - SDS

Solução III

Fórmula

Solução de Acetato de sódio 3 Molar (pH=4,8)

Acertar o pH com ácido glacial

Solução IV

Fórmula

100 nM – Acetato de sódio

50 nM – Tris-HCl (pH=8,0)

ANEXO III

Anexo III - A: Resultados da Temperatura da água e pH ao longo do sistema de lagoa de estabilização e da unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio, 2001/2002, Lins – SP.

Data	EA		SA		SF		UD	
	pH	Temp. água (°C)	pH	Temp. água (°C)	pH	Temp. água (°C)	pH	Temp. água (°C)
04.09.01	**	**	**	**	**	**	**	**
02.10.01	6,0	25,0	7,0	27,0	7,0	25,0	7,0	25,0
23.10.01	7,0	23,0	6,0	23,5	8,0	23,5	8,0	27,0
06.11.01	7,0	29,0	7,0	28,5	6,0	27,0	8,0	29,0
03.12.01	7,0	30,5	6,0	29,0	6,0	26,5	7,0	26,0
17.12.01	7,0	29,5	6,0	28,0	7,0	28,0	7,0	28,0
07.01.02	7,0	29,0	6,0	28,0	7,0	28,0	7,0	27,0
21.01.02	**	**	**	**	**	**	**	**
04.02.02	**	**	**	**	**	**	**	**
19.02.02	**	**	**	**	**	**	**	**
06.03.02	7,0	31,0	7,0	29,0	7,0	29,0	7,0	28,0
18.03.02	7,0	27,0	7,0	30,0	7,0	31,0	7,0	30,0
02.04.02	7,0	32,0	7,0	31,5	7,0	30,0	7,0	30,0
17.04.02	7,0	29,0	7,0	28,0	7,0	27,0	7,0	29,0
08.05.02	7,0	28,0	7,0	27,0	7,0	27,0	7,0	28,0
20.05.02	7,0	26,0	7,0	26,0	7,0	27,0	7,0	27,0
03.06.02	7,0	24,0	7,0	24,0	7,0	23,5	7,0	24,0
25.06.02	7,0	24,0	7,0	24,0	7,0	23,0	7,0	24,0
11.07.02	7,0	23,0	7,0	23,0	7,0	23,0	7,0	24,0
24.07.02	7,0	23,5	7,0	23,0	7,0	23,0	7,0	24,0
08.08.02	7,0	23,5	7,0	23,0	7,0	23,0	7,0	23,5
19.08.02	7,0	23,0	7,0	23,0	7,0	23,0	7,0	24,0
11.09.02	7,0	29,0	7,0	28,0	7,0	27,0	7,0	26,0
25.09.02	7,0	28,0	7,0	27,0	7,0	27,0	7,0	25,0
08.10.02	7,0	30,0	7,0	30,0	8,0	32,0	7,0	30,0
22.10.02	7,0	31,5	7,0	30,5	7,0	29,0		
06.11.02	7,0	30,0	**	**	7,0	30,0	7,0	29,0

(*) = não houve coleta

(**) = não foi realizada a medida

Anexo III - B: Parâmetros Físicos-Químicos ao longo do sistema de lagoas de estabilização e da unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio, 2001/2002, Lins – SP.

Ponto	Data	DBO (mg/L)	NA (mg/L)	PT (mg/L)	SST (mg/L)
Entrada Anaeróbia	04.09.01	447,0	25,5	10,9	322,0
Saída Aanaeróbia	04.09.01	119,0	17,2	7,1	32,0
Saída Facultativa	04.09.01	52,0	13,8	6,5	119,0
Tanque de Cloração	04.09.01	37,0	*	*	*
Entrada Anaeróbia	02.10.01	112,0	3,8	1,8	171,0
Saída Aanaeróbia	02.10.01	69,0	38,7	6,1	42,0
Saída Facultativa	02.10.01	59,0	27,8	4,8	7,7
Tanque de Cloração	02.10.01	58,0	*	*	*
Entrada Anaeróbia	24.10.01	376,0	25,3	6,0	240,0
Saída Aanaeróbia	24.10.01	199,0	18,2	7,4	160,0
Saída Facultativa	24.10.01	90,0	14,0	4,5	82,0
Tanque de Cloração	24.10.01	74,0	*	*	*
Entrada Anaeróbia	06.11.01	298,0	7,0	7,6	285,0
Saída Aanaeróbia	06.11.01	143,0	9,8	7,0	50,0
Saída Facultativa	06.11.01	96,0	4,8	7,0	230,0
Tanque de Cloração	06.11.01	69,0	*	*	*
Entrada Anaeróbia	03.12.01	504,0	52,4	6,5	340,0
Saída Aanaeróbia	03.12.01	170,0	29,1	6,3	80,0
Saída Facultativa	03.12.01	52,0	17,4	7,1	250,0
Entrada Anaeróbia	07.01.02	359,0	8,8	7,3	336,0
Saída Aanaeróbia	07.01.02	12,0	24,4	7,0	67,0
Saída Facultativa	07.01.02	65,0	10,7	6,5	193,0
Tanque de Cloração	07.01.02	63,0	*	*	*
Entrada Anaeróbia	21.01.02	552,0	12,6	6,6	284,0
Saída Aanaeróbia	21.01.02	110,0	31,0	5,3	66,0
Saída Facultativa	21.01.02	56,0	8,6	5,8	188,0
Tanque de Cloração	21.01.02	39,0	13,6	*	155,0
Entrada Anaeróbia	05.02.02	219,0	20,6	7,0	307,0
Saída Aanaeróbia	05.02.02	187,0	37,8	7,0	78,0
Saída Facultativa	05.02.02	62,0	9,8	6,1	210,0
Tanque de Cloração	05.02.02	55,0	9,9	*	180,0

DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio; NA = Nitrogênio Amoniacal; PT = Fósforo Total; SST = Sólidos Suspensos Totais

Anexo III - B: Parâmetros Físicos-Químicos ao longo do sistema de lagoas de estabilização e da unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio, 2001/2002, Lins – SP. (continuação)

Ponto	Data	DBO (mg/L)	NA (mg/L)	PT (mg/L)	SST (mg/L)
Entrada Anaeróbia	18.02.02	372,0	12,3	8,8	288,0
Saída Aanaeróbia	18.02.02	121,0	29,1	8,1	89,0
Saída Facultativa	18.02.02	51,0	10,1	6,5	263,0
Tanque de Cloração	18.02.02	32,0	10,3	*	190,0
Entrada Anaeróbia	06.03.02	291,0	11,0	9,1	240,0
Saída Aanaeróbia	06.03.02	93,0	14,6	8,3	80,0
Saída Facultativa	06.03.02	61,0	16,1	7,0	270,0
Tanque de Cloração	06.03.02	55,0	13,3	*	210,0
Entrada Anaeróbia	18.03.02	330,0	20,0	7,3	210,0
Saída Aanaeróbia	18.03.02	108,0	15,4	6,1	120,0
Saída Facultativa	18.03.02	80,0	11,1	6,0	150,0
Tanque de Cloração	18.03.02	63,0	9,0	*	110,0
Entrada Anaeróbia	02.04.02	328,0	16,7	8,8	180,0
Saída Aanaeróbia	02.04.02	168,0	13,1	5,3	8,0
Saída Facultativa	02.04.02	63,0	9,0	6,1	210,0
Tanque de Cloração	02.04.02	36,0	9,5	*	160,0
Entrada Anaeróbia	17.04.02	290,0	18,6	9,0	240,0
Saída Aanaeróbia	17.04.02	188,0	13,3	7,8	110,0
Saída Facultativa	17.04.02	67,0	11,5	8,0	230,0
Tanque de Cloração	17.04.02	52,0	9,0	*	200,0
Entrada Anaeróbia	08.05.02	298,0	17,3	8,5	280,0
Saída Aanaeróbia	08.05.02	165,0	12,7	8,0	205,0
Saída Facultativa	08.05.02	68,0	11,1	7,3	230,0
Tanque de Cloração	08.05.02	65,0	10,6	*	180,0
Entrada Anaeróbia	20.05.02	360,0	25,3	9,6	220,0
Saída Aanaeróbia	20.05.02	180,0	19,7	8,3	171,0
Saída Facultativa	20.05.02	78,0	16,9	7,9	153,0
Tanque de Cloração	20.05.02	63,0	13,9	*	110,0
Entrada Anaeróbia	03.06.02	275,0	11,0	8,0	205,0
Saída Aanaeróbia	03.06.02	143,0	10,1	6,6	160,0
Saída Facultativa	03.06.02	80,0	18,5	8,1	189,0
Tanque de Cloração	03.06.02	78,0	15,0	*	97,0

DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio; NA = Nitrogênio Amoniacal; PT = Fósforo Total; SST = Sólidos Suspensos Totais

Anexo III - B: Parâmetros Físicos-Químicos ao longo do sistema de lagoas de estabilização e da unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio, 2001/2002, Lins – SP. (continuação)

Ponto	Data	DBO (mg/L)	NA (mg/L)	PT (mg/L)	SST (mg/L)
Entrada Anaeróbia	25.06.02	98,0	11,5	8,6	170,0
Saída Aanaeróbia	25.06.02	128,0	15,6	7,8	120,0
Saída Facultativa	25.06.02	50,0	15,9	7,0	260,0
Tanque de Cloração	25.06.02	66,0	13,6	6,5	110,0
Entrada Anaeróbia	11.07.02	110,0	26,6	9,1	150,0
Saída Aanaeróbia	11.07.02	80,0	13,4	7,5	180,0
Saída Facultativa	11.07.02	43,0	15,1	8,6	110,0
Tanque de Cloração	11.07.02	40,0	14,0	3,7	90,0
Entrada Anaeróbia	24.07.02	276,0	27,2	8,6	185,0
Saída Aanaeróbia	24.07.02	159,0	24,6	7,9	100,0
Saída Facultativa	24.07.02	72,0	17,4	8,0	78,0
Tanque de Cloração	24.07.02	100,0	10,9	5,5	63,0
Entrada Anaeróbia	08.08.02	476,0	51,5	10,1	239,0
Saída Aanaeróbia	08.08.02	158,0	41,7	8,8	33,0
Saída Facultativa	08.08.02	123,0	29,7	8,3	107,0
Tanque de Cloração	08.08.02	71,0			
Entrada Anaeróbia	19.08.02	390,0	28,8	4,0	392,0
Saída Aanaeróbia	19.08.02	142,0	41,7	7,0	114,0
Saída Facultativa	19.08.02	63,0	26,3	4,5	140,0
Tanque de Cloração	19.08.02	51,0	25,2	3,9	103,0
Entrada Anaeróbia	11.09.02	250,0	23,0	8,1	254,0
Saída Aanaeróbia	11.09.02	141,0	45,4	7,0	57,0
Saída Facultativa	11.09.02	51,0	31,1	6,0	90,0
Tanque de Cloração	11.09.02	91,0	30,5	6,0	82,0
Entrada Anaeróbia	25.09.02	260,0	21,6	8,6	208,0
Saída Aanaeróbia	25.09.02	117,0	32,1	7,3	26,0
Saída Facultativa	25.09.02	48,0	28,3	6,0	87,0
Tanque de Cloração	25.09.02	71,0	23,0	6,4	66,0
Entrada Anaeróbia	08.10.02	298,0	28,8	7,3	397,0
Saída Aanaeróbia	08.10.02	163,0	47,6	6,6	53,0
Saída Facultativa	08.10.02	89,0	40,3	5,2	192,0
Tanque de Cloração	08.10.02	80,0	37,8	6,1	159,0
Entrada Anaeróbia	22.10.02	230,0	37,2	8,0	280,0
Saída Aanaeróbia	22.10.02	146,0	35,4	6,8	70,0
Saída Facultativa	22.10.02	90,0	30,6	6,0	156,0
Entrada Anaeróbia	06.11.02	300,0	17,1	7,8	250,0
Saída Facultativa	06.11.02	75,0	24,1	6,1	100,0
Tanque de Cloração	06.11.02	66,0	26,2	6,0	88,0

DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio; NA = Nitrogênio Amoniacal; PT = Fósforo Total; SST = Sólidos Suspensos Totais

Anexo III - C: Doses e Tempo de contato empregados no Sistema de Cloração – Julho de 2001 a Novembro de 2002

Data da coleta	Dosagem (mg/L)	Tempo de contato (minutos)
02.07.01	15,0	20
07.08.01	3,0	40
04.09.01	10	40
02.10.01	7,0	20
23.10.01	10,6	30
06.11.01	26,6	20
03.12.01	15	35
17.12.01	15,2	40
07.01.02	15,4	40
21.01.02	15,0	30
04.02.02	6,4	40
19.02.02	9,5	30
06.03.02	2,1	12
18.03.02	8,0	30
02.04.02	3,0	30
17.04.02	1,8	15
08.05.02	5,0	45
20.05.02	5,9	45
03.06.02	11,2	40
25.06.02	5,6	40
11.07.02	9,7	40
24.07.02	9,7	40
08.08.02	8,1	40
19.08.02	8,6	40
11.09.02	7,6	30
25.09.02	5,6	20
08.10.02	6,4	35

Anexo III - D: Datas das coletas e locais de amostragem realizadas no período de estudo, 2001/2002, Lins – SP.

Data	Entrada Anaeróbia	Saída Anaeróbia	Saída Facultativa	Tanque de Cloro
02.07.01	X	-	X	X
07.08.01	X	X	X	X
04.09.01	X	X	X	X
02.10.01	X	X	X	X
23.10.01	X	X	X	X
06.11.01	X	X	X	X
03.12.01	X	X	X	X
17.12.01	X	X	X	X
07.01.02	X	X	X	X
21.01.02	X	X	X	X
04.02.02	X	X	X	-
19.02.02	X	X	X	X
06.03.02	X	X	X	X
18.03.02	X	X	X	X
02.04.02	X	X	X	X
17.04.02	X	X	X	X
08.05.02	X	X	X	X
20.05.02	X	X	X	X
03.06.02	X	X	X	X
25.06.02	X	X	X	X
11.07.02	X	X	X	X
24.07.02	X	X	X	X
08.08.02	X	X	X	X
19.08.02	X	X	X	X
11.09.02	X	X	X	X
25.09.02	X	X	X	X
08.10.02	X	X	X	X
22.10.02	X	X	X	-
06.11.02	X	X	X	X

Anexo III - E: Densidade de Coliformes Totais e *E. coli* (NMP/100 mL) em amostras ao longo do sistema de lagoas de estabilização, 2001/2001, Lins – SP.

Data da coleta	Entrada Anaeróbia		Saída Anaeróbia		Saída Facultativa	
	Coli Total	<i>E.coli</i>	Coli Total	<i>E.coli</i>	Coli Total	<i>E.coli</i>
02.07.01	$1,3 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^9$	$2,4 \times 10^8$	$2,8 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$
07.08.01	$2,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	*	*	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
04.09.01	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	*	*	$2,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
02.10.01	$1,3 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^9$	$2,4 \times 10^8$	$2,8 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$
23.10.01	$1,7 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^9$	$3,2 \times 10^{10}$	$7,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$	$7,3 \times 10^9$
06.11.01	$2,2 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$1,4 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
03.12.01	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
17.12.01	$5,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
07.01.02	$1,7 \times 10^8$	$5,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$
21.01.02	$1,7 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
04.02.02	$1,1 \times 10^8$	$3,1 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	< 1
19.02.02	$9,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$
06.03.02	$6,8 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{11}$	$5,2 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{10}$	< 1
18.03.02	$> 2,4 \times 10^{13}$	$1,2 \times 10^{13}$	$1,9 \times 10^7$	$9,2 \times 10^5$	$1,9 \times 10^8$	$2,7 \times 10^6$
02.04.02	$1,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^7$	$9,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$
17.04.02	$2,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{11}$	$8,3 \times 10^5$
08.05.02	$8,6 \times 10^{11}$	$6,8 \times 10^7$	$5,7 \times 10^7$	$4,9 \times 10^6$	$9,2 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$
20.05.02	$1,7 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	$9,2 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$
03.06.02	$1,1 \times 10^{11}$	$1,7 \times 10^8$	$3,2 \times 10^6$	$9,9 \times 10^5$	$4,3 \times 10^9$	$8,3 \times 10^9$
25.06.02	$1,2 \times 10^9$	$7,2 \times 10^7$	$6,4 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$
11.07.02	$9,2 \times 10^7$	$7,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$4,1 \times 10^6$	$6,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$
24.07.02	$7,7 \times 10^{12}$	$7,3 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^7$	$3,3 \times 10^6$	$9,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
08.08.02	$2,4 \times 10^{13}$	$8,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^8$	$2,8 \times 10^5$
19.08.02	$9,2 \times 10^9$	$5,1 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$
11.09.02	$3,2 \times 10^9$	$5,7 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$	$2,4 \times 10^5$
25.09.02	$8,6 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$
08.10.02	$1,5 \times 10^2$	$4,1 \times 10^7$	*	*	$7,2 \times 10^6$	$8,6 \times 10^4$
22.10.02	$1,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	*	*	$> 2,4 \times 10^6$	$> 2,4 \times 10^5$
06.11.02	$1,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$	*	*	$2,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$

(*) = Não houve coleta

Fonte: RAZZOLINI, 2003

Anexo III - E: Densidade de Coliformes Totais e *E. coli* (NMP/100 mL) em amostras da unidade de desinfecção por hipoclorito de sódio. 2001/2002, Lins – SP. (Continuação)

Data da coleta	Dosagem (mg/L)	Tempo de contato (minutos)	Coli Total (NMP/100 mL)	<i>E. coli</i> (NMP/100 mL)
02.07.01	15,0	20	$2,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$
07.08.01	15,0	40	$1,7 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$
04.09.01	10,0	40	$1,5 \times 10^7$	< 1
02.10.01	7,0	20	$3,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$
23.10.01	10,6	30	$1,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$
06.11.01	26,6	20	$5,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$
03.12.01	15,0	35	< 2	< 2
17.12.01	15,2	40	$7,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$
07.01.02	15,4	40	< 2	< 2
21.01.02	15,0	30	< 2	< 2
04.02.02	6,4	40	< 1	< 1
19.02.02	9,5	30	22	2
06.03.02	2,1	12	$6,3 \times 10^7$	< 1
18.03.02	8,0	30	$3,4 \times 10^5$	< 1
02.04.02	3,0	30	$1,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^3$
17.04.02	1,8	15	$< 2,4 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^4$
08.05.02	5,0	45	$1,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^4$
20.05.02	5,9	45	$1,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^3$
03.06.02	11,2	40	< 1	< 1
25.06.02	5,6	40	$1,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
11.07.02	9,7	40	$2,4 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$
24.07.02	9,7	40	< 1	< 1
08.08.02	8,1	40	$2,4 \times 10^{10}$	< 1
19.08.02	8,6	40	$7,4 \times 10^5$	$3,5 \times 10^1$
11.09.02	7,6	30	$9,8 \times 10^7$	$3,2 \times 10^2$
25.09.02	5,6	20	$2,6 \times 10^4$	$6,6 \times 10^1$
08.10.02	6,4	35	$3,2 \times 10^5$	< 1

(*) = Não houve coleta

Fonte: RAZZOLINI, 2003.