

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

DETECÇÃO DE *AEROMONAS* spp. EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL E  
SEDIMENTO AO LONGO DE UM GRADIENTE DE SALINIDADE NO ESTUÁRIO  
DO RIO COCÓ - CEARÁ

CAMILA MAGALHÃES SILVA

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL  
ABRIL/2009

DETECÇÃO DE *AEROMONAS* spp. EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL  
E SEDIMENTO AO LONGO DE UM GRADIENTE DE SALINIDADE NO  
ESTUÁRIO DO RIO COCÓ - CEARÁ

CAMILA MAGALHÃES SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PÊSCA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PÊSCA.

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL

ABRIL/2009

B636c

Silva, Camila Magalhães

2009 *Aeromonas* sp. em amostras de água e sedimento do rio Cocó/ Camila Magalhães Silva – Fortaleza: UFC / Departamento de Engenharia de Pesca, orientador:Regine Helena dos Fernandes Vieira, 2009.86 p.

1. Dissertação. 2. *Aeromonas*. 3. Estuário. I.  
Título

CDD 574.19843

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

---

Camila Magalhães Silva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

Professora Dr. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira  
Orientadora da Dissertação  
Presidente

---

Professora Dr. Norma Suely Evangelista Barreto  
Co-orientadora da Dissertação  
Conselheira

---

Professora Dr. Oscarina Viana de Sousa  
Conselheira

*Dedico este trabalho ao meu marido e a minha  
filha, agora minha razão de viver.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela presença constante em minha vida, pelas oportunidades que sempre me Deste, pelas metas alcançadas, obstáculos superados, e por ter me permitido conhecer pessoas tão maravilhosas na minha vida.

Ao meu marido, pessoa maravilhosa que sempre me compreendeu e me apoiou nas decisões mais difíceis. Amo você.

A minha filha que apesar de tão pequena já é o motivo pelo qual acordo todas as manhãs, quando olho para você todas as dificuldades desaparecem, é inexplicável.

Ao João Carlos por ter acompanhado a mim e a meu dedicado marido em todas as coletas tornando-as mais divertidas.

A minha mãe Francimary e ao meu pai Orlando, duas pessoas maravilhosas que me ensinaram a fazer tudo com amor e dedicação. Meu muito obrigado.

Às minhas irmãs, Haysa Emanuele e Rhuana Letícia, para as quais nunca falo Te amo, quero aproveitar então para dizer agora: AMO VOCÊS.

A Nayana uma pessoa maravilhosa que me ensinou a arte da paciência e por quem tenho um carinho todo especial.

Aos meus amigos de laboratório: Buda, Edirsana, Gleire, Cris, Fábio, Giuseppe, Marília e Jackson. Obrigada pela ajuda e pela companhia.

Ao Carlos em especial, pessoa um pouco desligada é verdade, mas que foi de absoluta importância neste trabalho, pois sem você tudo teria sido mais difícil e trabalhoso também. A você meu muito obrigada de coração.

A Norma e a Oscarina por toda paciência que tiveram comigo e por nunca me faltarem quando precisei. Adoro vocês.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Regine, pelo apoio e criteriosa orientação demonstrados nesses anos de convivência e que foram determinantes na minha formação científica. A senhora não tem noção do quanto influencia minha vida, todas as palavras de agradecimento não são suficientes para demonstrar minha gratidão e admiração pela sua pessoa.

Ao Instituto de Ciências do Mar (Labomar) pelo uso de suas dependências.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo importante na aquisição dos reagentes e desenvolvimento da pesquisa

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada.

## SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
2.1. <i>Aeromonas spp</i>	5
2.2. Fatores de virulência	11
2.3. Taxonomia	14
2.4. Antibióticos	19
2.5. O Rio Cocó	22
<b>3. OBJETIVO GERAL</b>	<b>26</b>
3.1 Objetivos específicos	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
4.1. Preparo das amostras	30
4.1.1. Amostra de água	30
4.1.2. Amostra de sedimento	33
4.1.3. Identificação das cepas suspeitas de <i>Aeromonas sp.</i>	36
Teste em Agar Tríplice Açúcar e Ferro (Agar TSI)	36
Teste em Agar Gelatina Fosfato Sal (Agar AGS)	37
Teste de resistência ao O/129	37
Teste de oxidase	38
Teste da catalase	39

Produção de gás a partir da glicose	40
Produção de Indol	40
Motilidade	40
Prova de Voges-Proskauer	40
Fermentação de carboidratos	41
Descarboxilação de aminoácidos	41
4.1.4. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (Teste de Kirby - Bauer)	43
4.1.5. Cura de plasmídio	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>65</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>

## RESUMO

Este projeto teve como objetivo principal a pesquisa de *Aeromonas* spp. em água de superfície e sedimento em três pontos distintos ao longo do rio Cocó, Ceará. Foram realizadas coletas no período de outubro de 2007 a abril de 2008 gerando um total de 30 amostras de água e 30 de sedimento. A quantificação da comunidade bacteriana pertencente ao gênero *Aeromonas* foi feita através de plaqueamento direto sobre Agar Gelatina Fosfato Sal (Agar GSP acrescido de 20µg/mL de ampicilina). Nas amostras de água, os valores obtidos variaram de 10 a 7.050 UFC/mL e de 25 a 38.500 UFC/mL nos pontos A e B, respectivamente. Nas amostras de sedimento, as contagens variaram de 100 a 37500 UFC/g e 1.200 a 43.500 UFC/g nos pontos A e B, respectivamente. Nas amostras de água e sedimento do ponto C, os valores foram menores que 10 UFC (por mL ou g) em todas as coletas. As maiores contagens foram verificadas no mês de abril, período de chuva, e as menores no mês de setembro, período de estiagem. Foram feitos isolamentos e após identificação as estirpes foram submetidas à teste de antibiograma e à técnica da “cura” do plasmídeo. Dentre as 41 cepas isoladas, foram identificadas as espécies *A. caviae*, *A. sobria*, *A. trota*, *A. salmonicida* e *A. allossacharophyla*. Todas as cepas se mostraram sensíveis ao cloranfenicol e ceftriaxona. Todas as estirpes apresentaram resistência a, pelo menos, dois dos nove antibióticos testados. Após a técnica de cura, a maior parte da resistência a eritromicina ficou caracterizada como de origem plasmidial. Conclui-se que o estuário do Rio Cocó está contaminado por *Aeromonas* e que muitas delas apresentam resistências a antibióticos denotando um ambiente poluído e de risco para a população que usa suas águas para lazer, pesca ou outra atividade qualquer.

**Palavras-chave:** *Aeromonas*; Ambientes aquáticos; Resistência; Cura do plasmídeo.

## ABSTRACT

This research work was designed to detect the presence of *Aeromonas* in the Cocó River estuary, Fortaleza, Ceará State, Brazil. The database consisted of 30 samples of the river's surface water and 30 samples of the river's soil, in the period from September, 2007 to April, 2008.. They were amenable, simultaneously, to counting of bacteria on Agar Gelatin Phosphate Salt (GSP) plus 20µg/mL of ampicilim (UFC/mL or UFC/g) The results showed dissemination of *Aeromonas* in the estuary. The counts for the water samples varied from 10 to 7,050 and from 25 to 38,500 UFC/mL at points A and B respectively; and from 100 to 37,500 UFC/g, and 1,200 to 43500 UFC/g at points A and B respectively. At point C, the counts for water and sediment were smaller than 10 UFC per ml or gram in all samples The occurrence of the greatest indices of *Aeromonas* in April, at the height of the rainy season, and the lowest in Septemer, at the height of the dry season, suggests there to be a probable seasonality of bacteria density in the studied environment. Among the 41 isolated strains were found the species *A. caviae*, *A. sobria*, *A. trota*, *A. salmonicida* and *A. allossacharophyla*. All the strains of *Aeromonas* sp. were found to be sensitive to cloranfenicol and ceftriaxona except for ampicillim, to which they showed 100% resistance. All the stirps showed resistance to two out of the nine tested antibiotics. After the Curing' technique, the eritromicina resistance seems to be of plasmidian origin.

**Keywords:** *Aeromonas*, Antibiotics, Plasmids, Aquatic environment.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1.</b>	Protuberâncias causadas em carpas ( <i>Cyprinus carpio</i> ) por <i>A. hydrophila</i> .	10
<b>FIGURA 2.</b>	Lesão produzida por <i>A. hydrophila</i> na derme de um catfish ( <i>Ictalurus punctatus</i> ).	10
<b>FIGURA 3.</b>	Infecção epidérmica causada por <i>Aeromonas</i> sp.	12
<b>FIGURA 4.</b>	Reações de descarboxilase e hidrólise de Moller com uma ferramenta de organização de espécies	16
<b>FIGURA 5.</b>	Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por antibióticos	19
<b>FIGURA 6.</b>	Desenho esquemático de uma bactéria contendo plasmídios no seu interior	21
<b>FIGURA 7.</b>	Foto aérea da desembocadura do rio Cocó na orla marítima de Fortaleza.	23
<b>FIGURA 8.</b>	Depósito clandestino de pneus velhos às margens do rio Cocó	25
<b>FIGURA 9.</b>	Mapa do Rio Cocó com a descrição dos pontos de amostragem da pesquisa.	27
<b>FIGURA 10.</b>	Vista parcial do Rio Cocó, Fortaleza-Ceará. Ponto de coleta (PA)	28
<b>FIGURA 11.</b>	Vista parcial do Rio Cocó, Fortaleza-Ceará. Ponto de coleta (PB)	28
<b>FIGURA 12.</b>	Vista da Foz do Rio Cocó, Fortaleza, Ceará. Ponto de coleta (PC)	29
<b>FIGURA 13.</b>	Esquema representativo utilizado para identificação de <i>Aeromonas</i> nas amostras de água coletada em três diferentes pontos do rio Cocó, CE.	32

<b>FIGURA 14.</b>	Placa contendo o Agar GSP com crescimento característico de <i>Aeromonas</i> sp.	33
<b>FIGURA 15.</b>	Esquema representativo utilizado para identificação de <i>Aeromonas</i> nas amostras de sedimento coletada em três diferentes pontos do rio Cocó, CE.	35
<b>FIGURA 16.</b>	Tubos contendo o meio TSI (Agar Tríplice Açúcar e Ferro) representando positividade para <i>Aeromonas</i> sp.	36
<b>FIGURA 17.</b>	Tubo contendo o meio AGS (Agar Gelatina Fosfato Sal) representando positividade para <i>Aeromonas</i> sp.	37
<b>FIGURA 18.</b>	Teste de sensibilidade ao agente vibriostático O/129, mostrando <i>Aeromonas</i> sp. resistente às duas concentrações.	38
<b>FIGURA 19.</b>	Demonstração do teste de oxidase, sendo a placa da direita positiva.	38
<b>FIGURA 20.</b>	Teste da catalase positiva para <i>Aeromonas</i> sp.	39
<b>FIGURA 21.</b>	Esquema representativo utilizado para identificação de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas de água e sedimento do rio Cocó, CE.	42
<b>FIGURA 22.</b>	Esquema representativo utilizado para realização do antibiograma das cepas de <i>Aeromonas</i> isoladas de água e sedimento do Rio Cocó, CE.	45
<b>FIGURA 23.</b>	Esquema representativo utilizado para a realização da cura do plasmídio das cepas de <i>Aeromonas</i> multiresistentes isoladas de água e sedimento do Rio Cocó, CE.	47
<b>FIGURA 24.</b>	Ocorrência de <i>Aeromonas</i> em água de três pontos distintos do Rio Cocó, CE.	54
<b>FIGURA 25.</b>	Ocorrência de <i>Aeromonas</i> em sedimento de três pontos distintos do Rio Cocó, CE.	54
<b>FIGURA 26.</b>	Percentual de espécies de <i>Aeromonas</i> sp. identificadas em três pontos distintos do Rio Cocó, CE.	56

**FIGURA 27.** Percentual de resistência a antimicrobianos das cepas de *Aeromonas* isoladas de água e sedimento em três pontos distintos do Rio Cocó, CE.

60

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1.</b>	Espécies distribuídas dentro do gênero <i>Aeromonas</i> segundo Janda; Abbott, 1998.	6
<b>TABELA 2.</b>	Diferenciação das <i>Aeromonas</i> móveis de acordo com Carnahan et al. (1991) e modificada por Joseph; Carnahan (1994).	18
<b>TABELA 3.</b>	Padrão de interpretação do teste de difusão com medidas dos halos e resultados para sensibilidade, resistência e comportamento intermediário das cepas testadas frente aos antimicrobianos escolhidos.	44
<b>TABELA 4.</b>	Contagem padrão em placas (CPP) em UFC/mL em amostras de água coletadas no estuário do Rio Cocó,Ce, no período de agosto de 2007 a abril de 2008.	48
<b>TABELA 5.</b>	Contagem padrão em placas (CPP) em UFC/g em amostras de sedimento coletadas no estuário do Rio Cocó,Ce, no período de agosto de 2007 a abril de 2008.	49
<b>TABELA 6.</b>	Valores dos parâmetros físico-químicos medidos nas águas de superfície do estuário do rio Cocó, no período de agosto de 2007 a abril de 2008.	52
<b>TABELA 7.</b>	Perfil da susceptibilidade aos antimicrobianos das 41 cepas de <i>Aeromonas</i> isoladas da água e do sedimento em três pontos distintos do Rio Cocó, CE.	59
<b>TABELA 8.</b>	Perfil de multi-resistência antes e depois da cura, a microbianos isolados de água e sedimento em três pontos do Rio Cocó, CE.	64

## **Detecção de *Aeromonas* spp. em amostras de água superficial e sedimento ao longo de um gradiente de salinidade no estuário do rio Cocó - Ceará**

### **1. INTRODUÇÃO**

Os ambientes aquáticos são utilizados em todo o mundo para o abastecimento de água, geração de energia, irrigação, navegação, aquicultura e harmonia paisagística. No entanto, nas últimas décadas, esse precioso recurso vem sendo ameaçado pelas ações indevidas do homem, resultando em um prejuízo para a própria humanidade (MORAES; JORDÃO, 2002). Um exemplo disso é a ocupação da população ao longo das regiões costeiras que contribui para o aumento do risco de contaminação dos recursos hídricos por esgotos domésticos e outros agentes poluentes, como microrganismos patogênicos, substâncias orgânicas, metais pesados e elementos traço. A presença desses poluentes acarreta danos diretos e indiretos sobre os ecossistemas e organismos aquáticos, com a propagação de doenças através da água e dos alimentos contaminados. Por essa razão, a poluição do meio ambiente é uma preocupação de interesse público em todo o mundo, já que diversos países vêm sendo afetados por seus graves impactos, sendo um dos principais problemas ambientais é a utilização dos rios como principal receptor de esgotos, quer seja de origem doméstica ou industrial (TORRES, 2004).

Muitos ecossistemas aquáticos vêm tendo suas características naturais degradadas pelo crescente despejo de matéria orgânica rica em fosfato, compostos nitrogenados, oriundos de atividades humanas, principalmente, efluentes domésticos e industriais. Dentre esses ecossistemas destacam-se os estuários por serem altamente produtivos.

O termo estuário tem origem do latim *aestus*, que significa calor, fervura ou maré. O adjetivo *aestuarium*, especificamente, quer dizer tidal ou relativo a maré. A definição mais clássica de estuário diz que o “estuário é um corpo d’água costeiro, semifechado que tem livre comunicação com o mar aberto e dentro do qual a água do mar é mensuravelmente diluída com a água doce proveniente da bacia de drenagem” (CAMERON; PRITCHARD, 1963).

O rio Cocó, como a maioria dos rios brasileiros tem sofrido muitas intervenções antrópicas, causando mudanças nas suas características microbiológicas e no seu desenvolvimento.

A incidência de microrganismos em alimentos de áreas de transição entre o rio e o mar, como, por exemplo, as ostras, depende em grande parte da qualidade microbiológica em que estes animais se encontram. No cultivo de moluscos, os riscos de toxinfecções estão associados ao ambiente de cultivo. Em cultivo fechado o produtor exerce considerável controle sobre a qualidade intrínseca do produto, incluindo a segurança; em criadouro natural, entretanto, esse controle nem sempre é possível em razão do hábito alimentar dos indivíduos. Em águas estuarinas aumenta a possibilidade de contaminação com patógenos de esgoto e/ou ambiente (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2006).

As gastroenterites e ferimentos infectados geralmente são causados por bactérias autóctones de ambientes aquáticos, dentre as quais, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio sp.*, *Pseudomonas* e *Aeromonas*, as quais em função dos altos níveis de nutrientes na água, provenientes do aporte de material orgânico e esgoto doméstico, têm seu crescimento favorecido juntamente com outros microrganismos heterotróficos (CHOPRA et al., 1999).

Segundo Albert et al. (2000) é alta a prevalência de infecções mistas causadas por *Aeromonas sp.* associada a outros patógenos. De acordo com a Comissão de Código Alimentar da FAO/OMS, são recomendadas medidas para prevenir e controlar os ambientes aquáticos, tanto sob os aspectos físico-químicos como microbiológicos (SINNEL, 1981).

O gênero *Aeromonas* compreende microrganismos de *habitat* predominantemente hídrico, pertencentes a família *Aeromonadaceae*. Sua freqüência de isolamento é mais elevada nos meses de verão, tanto nas zonas temperadas como nas tropicais. No Brasil, diversos estudos revelaram a incidência de *Aeromonas spp.* no ambiente aquático (águas doces, salgadas, tratadas, estuarinas e de esgotos domésticos) em amostras de solo de jardim e áreas de recreação (ISONHOOD et al., 2002; PEREIRA et al., 2004). Essas bactérias também têm sido isoladas de vegetais e de uma variedade de produtos de origem animal incluindo carne bovina, aves, peixes, camarões, leite, etc. (GALBIS et al., 2002).

Embora o isolamento de *Aeromonas* do meio ambiente ainda receba pouca atenção, o número de surtos de gastroenterite envolvendo essas bactérias, encontra-se cada vez maior; o que pode mostrar uma relação

circunstancial entre os surtos e atividades recreacionais em ambientes aquáticos (MARCEL et al., 2002).

Por este motivo é que o projeto propõe investigar a presença de *Aeromonas* microorganismo na água e sedimento do rio Cocó, tendo em vista que esse corpo d'água é reconhecido como receptor final de efluentes de esgotos domésticos e industriais, mas que também apresenta um papel importante como fonte de alimento para a população ribeirinha.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Aeromonas* spp

O gênero *Aeromonas* vem passando por diversas revisões taxonômicas e de nomenclatura nos últimos 15 anos. Inicialmente foram incluídas na família *Vibrionaceae* (VÉRON, 1965), juntamente com os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Plesiomonas*. Esse esquema de classificação sistemática era conveniente, pois os três gêneros eram fenotipicamente similares, pertenciam ao mesmo ecossistema (água, peixe, répteis e anfíbios) e provocavam os mesmos espectros de doenças (gastrenterites e septcemias) (MACDONELL et al., 1985). Recentemente técnicas moleculares sofisticadas, incluindo seqüência de rRNA 16S, indicaram que esses três gêneros não são próximos entre si na base evolucionária, ou seja, as *Plesiomonas* estão mais próximas das *Enterobacteriaceae* (RUIFY et al., 1994). Essa conclusão resultou na remoção das *Aeromonas* da família *Vibrionaceae* para uma nova família denominada *Aeromonadaceae* (COLWELL et al., 1986).

Assim o gênero *Aeromonas* classificado na família *Aeromonadaceae*, é composto por 65 espécies, com quatro subespécies de *Aeromonas hydrophyla* e cinco subespécies de *Aeromonas salmonicida*. Algumas dessas espécies são responsáveis por um significativo número de infecções intestinais e extraintestinais tanto em humanos como em animais (peixes) (Tabela 1), podendo ocorrer ainda bacteremia, meningite, infecções em feridas e infecções pulmonares e do trato urinário em humanos (THORNLEY et al., 1997; JANDA,

ABBOTT, 1998). Embora as *Aeromonas* tenham sido isoladas de pacientes que sofrem de diarreia, o seu papel etiológico em gastroenterite ainda não está bem esclarecido (ALBERT et al., 2000).

**Tabela 1:** Espécies distribuídas dentro do gênero *Aeromonas* segundo Janda e Abbott, (1998).

<i>Aeromonas</i> associadas a doenças em humanos		
Mais patogênicas	Menos patogênicas	Espécies ambientais
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas veronii</i> <i>bv veronii</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
<i>Aeromonas veronii</i> <i>bv sobria</i>	<i>Aeromonas schuberti</i>	<i>Aeromonas media</i>
		<i>Aeromonas eucrenophila</i>
		<i>Aeromonas trola</i>
		<i>Aeromonas allosaccharophila</i>
		<i>Aeromonas encheleia</i>
		<i>Aeromonas bestiarum</i>
		<i>Aeromonas popoffii</i>

Segundo Nojimoto et al. (1997) a investigação epidemiológica de *Aeromonas* spp associada à diarreia na América do Norte, Europa e Sudeste da Ásia tem demonstrado substancial variação geográfica quanto à frequência do isolamento e a intensidade da doença associada a esse microrganismo, tendo os estudos apontados que nas gastroenterites provocadas por *Aeromonas* spp suspeita-se de transmissão através da água.

Os representantes do gênero *Aeromonas* (do grego *aer-aire* = ar ou gás e *monas* = unidade; portanto, unidade produtora de gás), são bastonetes gram-negativos, com 1,0 a 3,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,3 a 1,0  $\mu\text{m}$  de largura, normalmente encapsulados e não esporulados. São anaeróbios facultativos e monotríquios, embora quando mantidos em culturas por longo tempo em meio sólido, podem formar flagelos peritríquios. Utilizam a glicose como única fonte de energia com produção de ácido com ou sem gás (MAALEJ et al., 2003).

Com relação aos parâmetros de crescimento, crescem na ausência de cloreto de sódio (NaCl), com uma temperatura mínima de 0° a 5°C e máxima de 38° a 41°C. As espécies que causam patogenia humana crescem entre 10° e 42°C. Os valores de pH para crescimento oscilam entre 5,5 a 9,0. Algumas espécies hemolíticas são resistentes ao agente vibriostático 2,4 diamino-6,7-diisopropil-timina (O129) e em sua maioria, produtoras de citotoxinas, endotoxinas, enterotoxinas, proteases, adesinas, proteinases e quitinases (ALTWEGG; GEISS 1999). Outras provas bioquímicas e testes de susceptibilidade a antimicrobianos podem ser necessárias para a correta caracterização do gênero devido à existência de algumas cepas sensíveis a

esse antimicrobiano na concentração de 150 µg, embora raramente reportadas (CARNAHAN; JOSEPH, 2003).

Diz-se que cepas de *Aeromonas* móveis têm crescimento ótimo à temperatura de 28°C. Entretanto, como constitui um grupo muito heterogêneo, amostras com temperatura de crescimento variada (< 5° a 45°C) têm sido descritas (RODRIGUES; RIBEIRO, 2004).

A morfologia celular das espécies de *Aeromonas* é muito variável. Os bacilos podem variar desde formatos cocóides até formas finas e filamentosas. Em geral, as células são descritas como retas ou bacilares com extremidades arredondadas, apresentando-se isoladas, aos pares ou em cadeias curtas (ICMSF, 1998).

*Aeromonas* são organismos onipresentes encontrados no solo, em ambientes aquáticos como águas doces, marinhas e estuarinas, poluídas através de esgotos ou por animais; alimentos contaminados, inclusive carne, pescado, frutos do mar, leite e legumes; e no intestino de humanos aparentemente saudáveis e/ou com diarreia (FIORENTINI et al., 1998). Essas bactérias são abundantes nas regiões tropicais principalmente nos meses de verão, consideradas oportunistas, têm sido implicadas como uma das principais causas de enterite bacteriana, afetando principalmente crianças e viajantes, sendo a diarreia em sua forma moderada aguada e, em raras vezes, se assemelha a cólera em sua forma mais severa (HAVELAAR et al., 1992).

Com relação à patogenia, a espécie *A. hydrophila* é a mais importante, sendo considerada patogênica para anfíbios (MOURINO et al., 2006), répteis (PASQUALE et al., 1994) e peixes (ESPOSTO et al., 2007) provocando

principalmente septicemia, hemorragias e úlceras na cauda e nadadeiras (AUSTIN; ADAMS, 1996). Também já foram relacionadas a aborto em bovinos (WOHLEGEMUTH et al., 1972). A espécie *A. salmonicida* não é considerada patogênica ao homem, embora seja reconhecidamente patogênica para uma grande variedade de peixes (WALKER; BROOKS, 1993). Segundo Buchanan e Palumbo (1985) as espécies *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae* são tidas como as mais patogênicas ao homem, embora esta última em menor escala (REINA et al., 1991). As demais espécies estão envolvidas em casos esporádicos (REINA; LOPEZ, 1996).

As principais patologias em peixes incluem infecções agudas e crônicas, diferindo intra e interespecificamente na patogenicidade e habilidade de causar doenças (ROCCO; CIPRIANO, 2001). *Aeromonas caviae* e *A. sobria* também são citadas como espécies potencialmente patogênicas aos peixes (FIGUEIREDO et al., 2008). Como infecções agudas têm-se quadros de septicemias fatais que podem ocorrer tão rápido que o peixe morre antes de desenvolver os sintomas da doença ou desenvolve apenas sinais fracos, que quando aparecem pode apresentar exoftalmia, avermelhamento da pele e acúmulo de fluidos nas escamas (ESTEVES, 1988) (Figura 1).



**Figura 1.** Protuberâncias causadas em carpas (*Cyprinus carpio*) por *A. hydrophila*.

Já as infecções crônicas causadas pelas *Aeromonas* móveis se manifestam primeiramente com o aparecimento de úlceras na pele, seguida por hemorragias focais e inflamações visíveis. As úlceras aparecem tanto na derme quanto na epiderme, enquanto abaixo da musculatura ocorre severa necrose (PLUMB, 1994). (Figura 2).



**Figura 2.** Lesão produzida por *A. hydrophila* na derme de um catfish (*Ictalurus punctatus*).

## 2.2. Fatores de Virulência

Nos seres humanos essas bactérias podem causar diarreias, septicemias, inflamação do tecido conjuntivo e síndrome hemolítica urêmica, especialmente em indivíduos imunodeprimidos (JANDA; ABBOTT, 1998). Relatos de feridas infectadas por *Aeromonas* têm sido amplamente citados na literatura. De acordo com Corredoria et al. (1994) diversas gastroenterites e infecções podem acarretar sérios problemas ao indivíduo infectado, como por exemplo, a amputação do membro afetado e até mesmo morte. As feridas causadas por cepas de *Aeromonas* estão dentro de três categorias, listadas de acordo com a ordem de severidade e danos causados, são elas: celulites, mionecrose e eritema gangrenoso (Figura 3).

A água e os alimentos são importantes fontes de infecção por *Aeromonas* spp. nos seres humanos (KIROV, 2001). As gastroenterites destacam-se como as infecções mais comuns, podendo ser autolimitantes ou severas (CHAMPSAUR et al., 1982; FREITAS et al., 1998; JANDA; ABBOTT, 1998).



**Figura 3.** Infecção epidérmica causada por *Aeromonas* sp.

Nos últimos anos as aeromonas, em particular a espécie *A. hydrophila*, tem recebido especial atenção, devido ao seu papel como possível agente de surtos diarréicos transmitidos pelos alimentos (HUSS, 1997). *A. hydrophila* é caracterizada como sendo móvel por um flagelo polar simples, catalase e oxidase positiva, com fermentação de glicose e habilidade de crescer em baixas temperaturas, como -0 a 1°C (ADAMS; MOSS, 2000). De acordo com Kirov (2003) a patogenicidade e virulência dessa espécie depende da habilidade de produzir fatores associados a gastroenterites.

Gobat e Jemmi (1993) relataram que cepas de *A. hydrophila* têm sido freqüentemente isoladas de amostras de carne, peixe e frutos do mar, todavia a água mineral também tem sido uma possível fonte de contaminação para os humanos.

As *Aeromonas* produzem uma variedade de fatores de virulência similar a outras espécies de bactérias como *Escherichia coli* (JANDA, 1991), incluindo

toxinas extracelulares e enzimas. Dentre as toxinas produzidas destacam-se as hemolisinas, enterotoxinas, citotoxinas e adesinas. A enterotoxina citotóxica, também conhecida como “aerolisinas” com atividade enterotóxica, citotóxica e hemolítica, tem sido descrita como o mais poderoso fator de virulência associado com doenças gastrintestinais mediadas por *Aeromonas* (MARTINS et al., 2002).

Já as citotoxinas e as enterotoxinas, incluindo aquelas com atividade hemolítica, são as mais importantes para a patogenicidade das *Aeromonas* (BOTTARELLI; OSSIPRANDI, 1999). As enterotoxinas são produtos extracelulares, excretados para fora da célula bacteriana, que podem agir sobre o epitélio intestinal, produzindo inflamação. As aeromonas também podem produzir substâncias extracelulares, com significantes fatores de difusão, ou seja, proteases, amilases, citinases, nucleases e outras com papel de patogenicidade desconhecida. As proteases podem contribuir para a patogenicidade causando danos diretos nos tecidos ou aumentando a capacidade de invasão (MERINO et al., 1995).

Resultados de análises moleculares conduzidas por Zhang et al. (2000) comparando isolados virulentos com isolados não virulentos mostraram que a virulência de *Aeromonas* móveis depende de uma variedade de fatores. Os dados mostraram que os genes do fragmento 22 DNA estão presentes em muitas cepas virulentas, e que esses genes codificam cinco fatores de virulência conhecidos da *A. hydrophila*, incluindo hemolina, protease e proteína da multiresistência a antibióticos.

Para Rodrigues e Ribeiro (2004) uma variedade de toxinas pode ser produzida, no entanto, nem todas as cepas produzem todas as toxinas conhecidas atualmente. Além disso, em algumas amostras que possuem os genes de toxinas, estes só são expressos sob certas condições de crescimento.

Embora diversos trabalhos tenham sido realizados com o objetivo de identificar os fatores de virulência ou os mecanismos de patogenicidade das cepas de *Aeromonas* em homens e animais; atualmente somente um fator, produzido por *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. veronii* e *A. sobria*, ou seja, a camada “S” comumente conhecida como camada “A”, que possui várias atividades biológicas, está sendo relacionada à virulência dessas espécies (BOTTARELLI; OSSIPRANDI, 1999).

### **2.3. Taxonomia**

Devido ao fato das características bioquímicas, genéticas e sorológicas das *Aeromonas* móveis serem heterogêneas, a posição taxonômica desse gênero tem sido instável. Kluver e van Niel (1936) transferiram muitos organismos que estavam associados com septicemias hemorrágicas em peixes dentro do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus* e *Aerobacte* para um, então, novo gênero chamado *Aeromonas*.

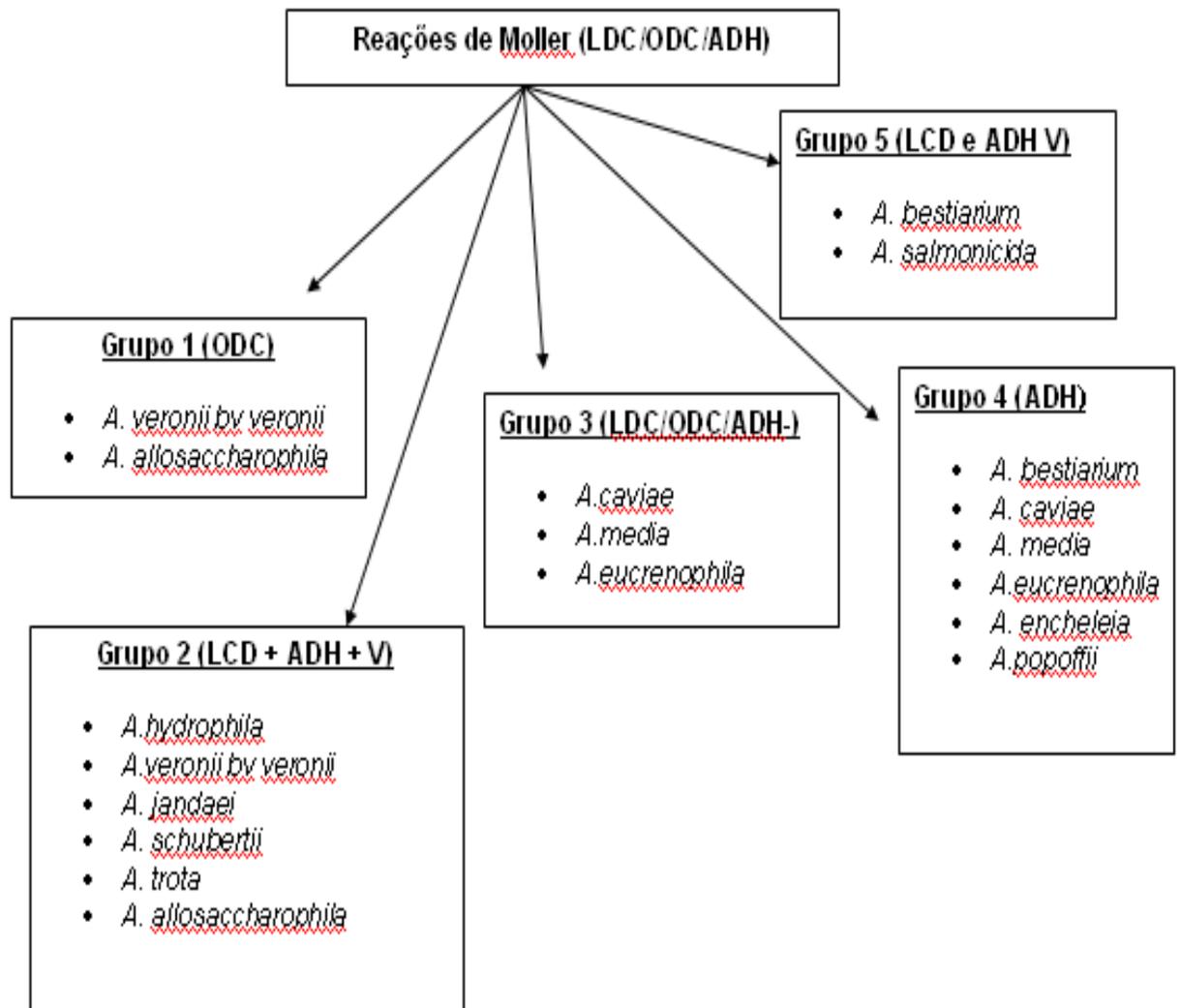
As *Aeromonas* eram células pequenas, gram-negativas com um flagelo simples que fermentavam a glicose com ou sem produção de gás. Mais tarde,

Snieszko (1957) dividiu o gênero em três espécies *A. hydrophila*, *A. punctat* e *A. liquefaciens*.

No esquema de Snieszko, *A. liquefaciens* continha o maior número de espécies patogênicas aos peixes. Entretanto, Schubert (1967) confirmou que essas similaridades bioquímicas não eram suficientes para estabelecer o gênero *Aeromonas*.

Em 1976, Popoff e Vernon, demonstraram que as aeromonas móveis poderiam ser classificadas dentro de duas espécies distintas, ou seja, *A. hydrophila* (composta por organismos previamente descritos como *A. punctata* e *A. liquefaciens*) e uma nova espécie que eles chamaram de *A. sobria*. Bioquimicamente *A. hydrophila* hidroliza a esculina e fermenta a arabinose, enquanto *A. sobria* não utiliza esses componentes (LALLIER et al., 1981).

Com relação às características fenotípicas, as aeromonas móveis são citocromo oxidase positiva, fermentam glicose com ou sem produção de gás, e são resistentes ao agente vibriostático O/129 (LALLIER et al., 1981). Um teste para identificar *Aeromonas* até o nível de espécie pode ser guiado pelos resultados das reações de descarboxilação e hidrólise de Moller. Por exemplo, as cepas ornitina descarboxilase-positiva (grupo 1) podem ser *A. veronii* biogrupo *veronii* (mais comum) ou *A. allosacchrophila* (uma única cepa relatada), enquanto cepas lisina descarboxilase-negativa, ornitina descarboxilase-negativa e arginina hidrolise-negativa (grupo 3) podem ser restritas ao complexo de *A. caviae* (*A. caviae*, *A. media* e *A. eucrenphila*) ou *A. enchleia* (ABBOT et al., 2003) (Figura 4).



**Figura 4.** Reações de descarboxilase e hidrólise de Moller como uma ferramenta de organização de espécies. (LDC - lisina descarboxilase; ODC - ornitina descarboxilase; ADH - arginina hidrolase e V - variável).

As diferenciações bioquímicas entre as sete espécies móveis mais comumente isoladas podem ser feitas usando-se os critérios de Carnahan et al. (1991) modificados por Joseph e Carnahan (1994), como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2:** Diferenciação de *Aeromonas* móveis de acordo com Carnahan et al. (1991), modificada por Joseph e Carnahan (1994). Todas os isolados são bacilos gram-negativas, oxidase-positiva, fermentadores de glicose e resistentes ao agente vibriostático O129.

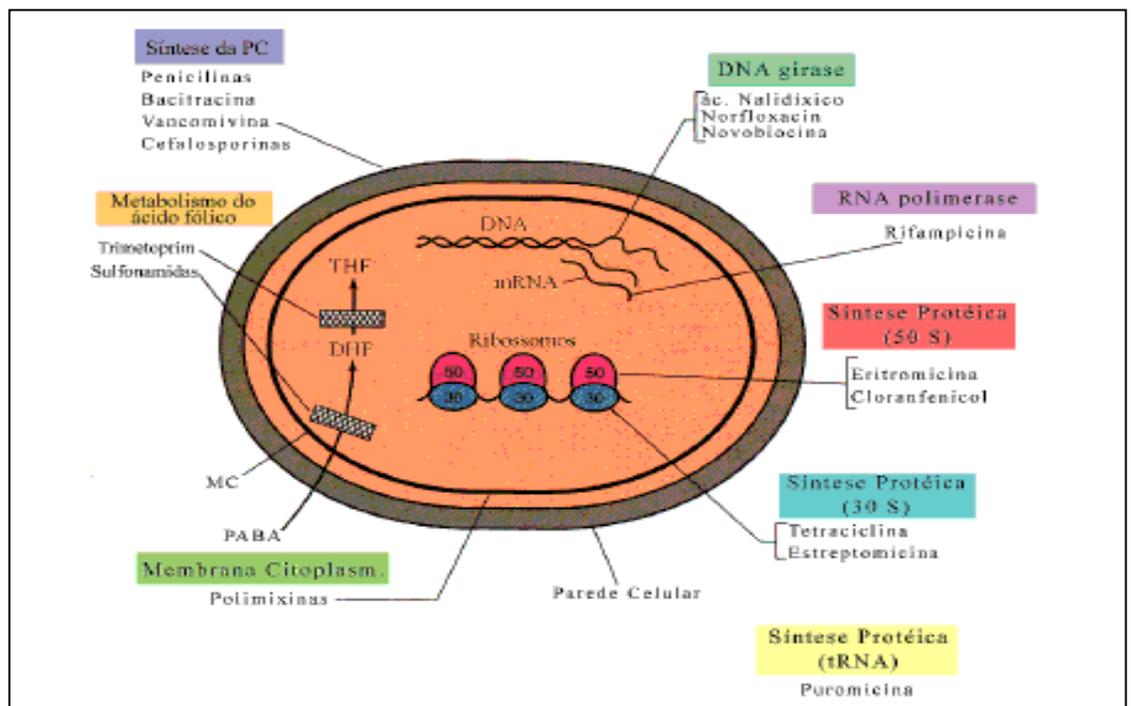
<sup>a</sup> +, positivo para 70% dos isolados; - negativos, isto é, positivo para menos de 30% dos isolados; V, variável; R, resistente; S, susceptível

<sup>b</sup> MIC (diluição simples), 4 µg/mL.

Características <sup>a</sup>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii bv</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. trota</i>
Hidrolise da esculina	+	-	+	+	-	-	-
Reação de VP	+	+	+	-	V	+	-
Atividade da pirazinamidase	+	-	-	+	-	-	-
Fermentação da Arabinose	V	-	-	+	-	-	-
Fermentação do Manitol	+	+	+	+	-	+	+
Fermentação da Sacarose	+	+	+	+	-	-	-
Susceptibilidade a Ampicilina	R	R	R	R	R	R	S
Susceptibilidade Carbenicilina	R	R	R	R	R	R	S
Susceptibilidade a Cefalotina	R	S	S	R	S	R	R
Susceptibilidade a Colistina <sup>b</sup>	V	S	S	S	S	R	S
Descarboxilase da Lisina	+	+	+	-	+	+	+
Descarboxilase da Ornitina	-	-	+	-	-	-	-
Hidrólise da Arbutina	+	-	+	+	-	-	V
Produção de Indol	+	+		+	-	+	+
Produção de H <sub>2</sub> S	+	+	+	-	-	+	+
Formação de gás na Glicose	+	+	+	-	-	+	+

## 2.4. Antibióticos

O termo quimioterapia foi criado pelo médico e pesquisador alemão Paul Ehrlich para descrever o uso de substâncias químicas para matar organismos patogênicos sem prejudicar o hospedeiro. Atualmente a quimioterapia se refere ao uso de substâncias químicas para tratar as mais variadas doenças. Em microbiologia ocorre o estudo dos agentes antimicrobianos, um grupo especial de agentes quimioterápicos usados para tratar doenças causadas por micróbios. Assim, em termos modernos, um agente antimicrobiano é sinônimo de um agente quimioterápico e vários são os possíveis alvos para esses agentes (BLACK, 1990) (Figura 5).



**Figura 5.** Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por antibióticos.

Segundo Koehler e Ashdown (1993) uma área que vem recebendo especial atenção nos últimos anos é a susceptibilidade *in vitro* de espécies de *Aeromonas* a diversos agentes quimioterápicos.

Diversas aeromonas são sensíveis aos antimicrobianos tetraciclina, aminoglicosídeos, as cefalosporinas de terceira geração, as quinolonas (JANDA; ABBOTT, 1995) e à ampicilina (SEIDLER et al., 1980). Estudos de isolados de *A. hydrophila* resistentes a antibióticos têm indicado a existência de muitas cepas patogênicas altamente resistentes a muitos antibióticos aplicados a prática clínica, o que pode começar a dificultar cura de doenças causadas por essas bactérias (DASKALOV, 2006).

Chaudhury et al. (1996) relataram o aumento na incidência de cepas de *Aeromonas* sp. multiresistentes isoladas tanto de fontes clínicas quanto ambientais. Por isso, existe em todo o mundo um grande interesse no que diz respeito à elevada prevalência de bactérias resistentes a antibióticos. Atualmente já se aceita a idéia de que o principal fator de risco para o aumento na resistência de bactérias patogênicas é o uso indiscriminado de antibióticos.

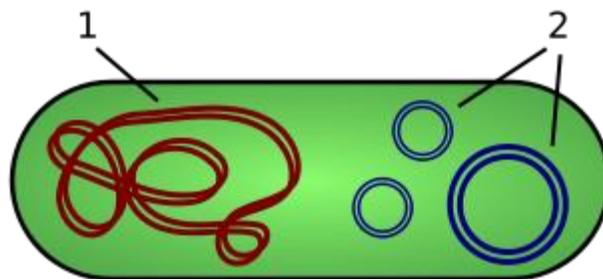
Para Schmidt et al. (2001) há um significativo efeito da aquicultura na resistência a antibióticos em cepas de *Aeromonas* móveis (incluindo *A. hydrophila*). Altos índices de multiresistência indicam transferência horizontal de genes de resistência, ou seja, a passagem de material genético diretamente para uma célula viva ou um organismo, seguido de sua expressão.

A associação de múltipla resistência a diferentes antimicrobianos com potencial transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias

filogeneticamente próximas ou não, é uma realidade cada vez mais preocupante (RHODES et al., 2000).

Por outro lado, a resistência antimicrobiana e os fatores de virulência em *Aeromonas* spp. vêm sendo correlacionados com a presença de plasmídios (CASAS et al., 2005). A presença desses elementos móveis é um risco, porque eles podem ser transferidos de outras bactérias patogênicas para as aeromonas (PALU et al., 2006) e estas passam a ser veiculadoras desses genes para bactérias patogênicas ou não patogênicas, contaminando humanos e peixes (JÚNIOR, 2006).

Os plasmídios são elementos extracromossômicos com capacidade de duplicação autônoma e que podem variar de poucos kilobases (2-3 kb) a mais de 500 kb que estão presentes em algumas espécies de bactérias (Figura 6). Esses elementos são tipicamente moléculas circulares de DNA, embora formas lineares tenham sido isoladas de espécies como *Borrelia*, *Streptomyces* e *Rhodococcus* (SOBECKY, 1999).



**Figura 6:** Desenho esquemático de uma bactéria contendo plasmídios no seu interior. (1) DNA cromossômico. (2) Plasmídios.

Segundo Goni-Urriza et al. (2000) a contaminação do ambiente com antibióticos e outros poluentes contribui para o aparecimento e a manutenção de

genes resistentes. A transferência desses genes está ligada ao fato de que cepas de bactérias resistentes a antibióticos e metais pesados foram isoladas de ambientes aos quais não eram diretamente expostos (MOROZZI et al., 1996).

Castro-Escarpulli et al. (2003) provaram que o maior efeito de antibióticos contra *A. hydrophila* tem sido com as quinolonas de primeira geração e as cefalosporinas de terceira geração.

As bactérias patogênicas têm desenvolvido diversas estratégias para resistirem à ação dos antibióticos, incluindo modificação e inativação da droga, ou ainda a exclusão do antibiótico (GROHMANN et al., 2003).

Para Umolu et al. (2006) a susceptibilidade a antibióticos de isolados bacterianos não é constante, mas dinâmica e varia com o tempo e o ambiente. Para isso se faz necessário uma amostragem periódica de patógenos bacterianos comuns com perfil de susceptibilidade em diferentes comunidades.

## **2.5. O Rio Cocó**

O rio Cocó é um corpo d'água que se estende sobre áreas dos municípios de Fortaleza, Maracanaú, Aquiraz, Maranguape e Pacatuba, cobrindo uma área da ordem de 500 km<sup>2</sup> e tendo no seu curso principal uma extensão de quase 50 km. Desde a sua nascente em Pacatuba até o estuário em Fortaleza, recebe diversas denominações, iniciando com o nome de riacho Pacatuba, na serra da Aratanha, após os primeiros quilômetros, em seguida recebe o nome de riacho Gavião, ao

alimentar um dos reservatórios que abastece a região metropolitana de Fortaleza e logo após o encontro com o riacho Timbó passa a se chamar Cocó (Figura 7). Em seu percurso, o rio Cocó drena cerca de 60% das águas da região metropolitana de Fortaleza (AUMEF, 1987).



**Figura 7:** Foto aérea da desembocadura do rio Cocó na orla marítima de Fortaleza (Foto: Fortaleza Guia Digital, 2001).

Vasconcelos e Freire (1987) consideram o rio Cocó como um curso d'água de pequeno porte, tipicamente metropolitano e que se acha poluído pelos esgotos domésticos e industriais situados ao longo de suas margens.

Pela margem esquerda do rio está localizado o Parque Ecológico Adahil Barreto, mais conhecido como “Parque do Cocó”. Ao cruzar a ponte da avenida Engenheiro Santana Júnior observa-se uma maior faixa de mangue pela sua margem esquerda. Na margem direita, observam-se impactos de aterramento ocorridos pela construção do Shopping Center Iguatemi, para via de acesso e área

de estacionamento. Ao receber as águas de seu último afluente, o rio Coaçu, o rio Cocó deságua no Atlântico em uma localidade conhecida como Barra do Cocó que limita a praia do Futuro da praia de Sabiaguaba (PESSOA, 2002).

O clima predominante na microrregião onde está localizada a bacia de drenagem do rio Cocó, de acordo com a classificação de Köppen, é considerado como sendo do tipo AW, o que corresponde ao tropical chuvoso, quente e úmido, com chuvas concentradas no verão e outono (IPLANCE, 1995).

O manguezal do Rio Cocó, em seus trechos preservados, forma uma mata de mangues de rara beleza, situado no coração de Fortaleza, onde várias espécies de moluscos, crustáceos, peixes, répteis, aves e mamíferos compõem cadeias alimentares com ambientes propícios para a reprodução, desova, crescimento e abrigo natural (DA SILVA, 1987).

Von Sperling (2003) destaca que a recreação é um dos usos mais nobres do ambiente aquático, juntamente com a harmonia paisagística. Por contato primário entende-se o contato direto e prolongado com a água, seja pelo banho, natação, mergulho, esqui aquático, surfe etc., em que a possibilidade de ingerir quantidades apreciáveis de água é elevada. Segundo o mesmo autor, no contato secundário não há o contato direto com o meio líquido, como, por exemplo, tem-se a navegação de lazer, pesca ou lazer contemplativo.

Numa visão integrada, a Bacia do Rio Cocó está poluída, o saneamento básico não é suficiente e a mata ciliar está bastante deteriorada. Tudo isso se concentra e agrava-se quando o rio chega em Fortaleza, onde se encontra assoreado e com muito lixo (Figura 8) (MEIRELES, 2008).



**Figura 8.** Depósito clandestino de pneus velhos as margens do rio Cocó (Foto: PESSOA, 2002).

O valor ecológico do rio Cocó para a cidade de Fortaleza é muito grande; no controle de enchentes, na preservação da biodiversidade, no desenvolvimento da pesca no estuário e mar, na importância paisagística e turística, no controle do clima, no espaço de lazer e educação ambiental que o rio Cocó, o manguezal e sua planície de inundação propiciam um dos principais recursos hídricos superficiais do município de Fortaleza (PESSOA, 2002).

### **3. OBJETIVO GERAL**

Quantificar e identificar a comunidade de *Aeromonas* spp. cultiváveis presentes em água de superfície e sedimento ao longo do estuário do rio Cocó, Ceará.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Realizar a contagem padrão em placas, isolar e identificar cepas de *Aeromonas* em amostras de água e sedimento;
- Verificar a correlação das bactérias identificadas com os fatores físico-químicos, salinidade, temperatura e pH do ambiente;
- Determinar os perfis de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos entre as espécies de *Aeromonas*;
- Estabelecer a possível origem genômica da resistência entre estirpes que se apresentaram resistentes a dois ou mais antimicrobianos testados.





**Figura 10.** Vista parcial do Rio Cocó, Fortaleza-Ceará. Ponto de coleta (PA) (Parque Adahil Barreto).



**Figura 11.** Vista parcial do Rio Cocó, Fortaleza-Ceará. Ponto de coleta (PB) (Ponte próxima ao Iguatemi).



**Figura 12.** Vista da Foz do Rio Cocó, Fortaleza, Ceará. Ponto de coleta (PC) (Praia do Caça e Pesca).

As amostras eram coletadas no período da manhã, com condições variáveis de maré, e nos locais de coleta era medida a temperatura, utilizando-se um termômetro com coluna de mercúrio, da marca ICOTERM. Em seguida, as amostras eram levadas imediatamente ao laboratório de microbiologia ambiental e do pescado no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, sob refrigeração, onde eram feitos o processamento das amostras, com medições do pH e salinidade.

As coletas de água eram realizadas a uma profundidade de aproximadamente 30 cm abaixo da superfície da água, utilizando-se frascos esterilizados de boca larga com tampas esmerilhadas, enquanto as amostras de sedimento eram acondicionadas em sacos de polietileno.

## 4.1. Preparo das amostras

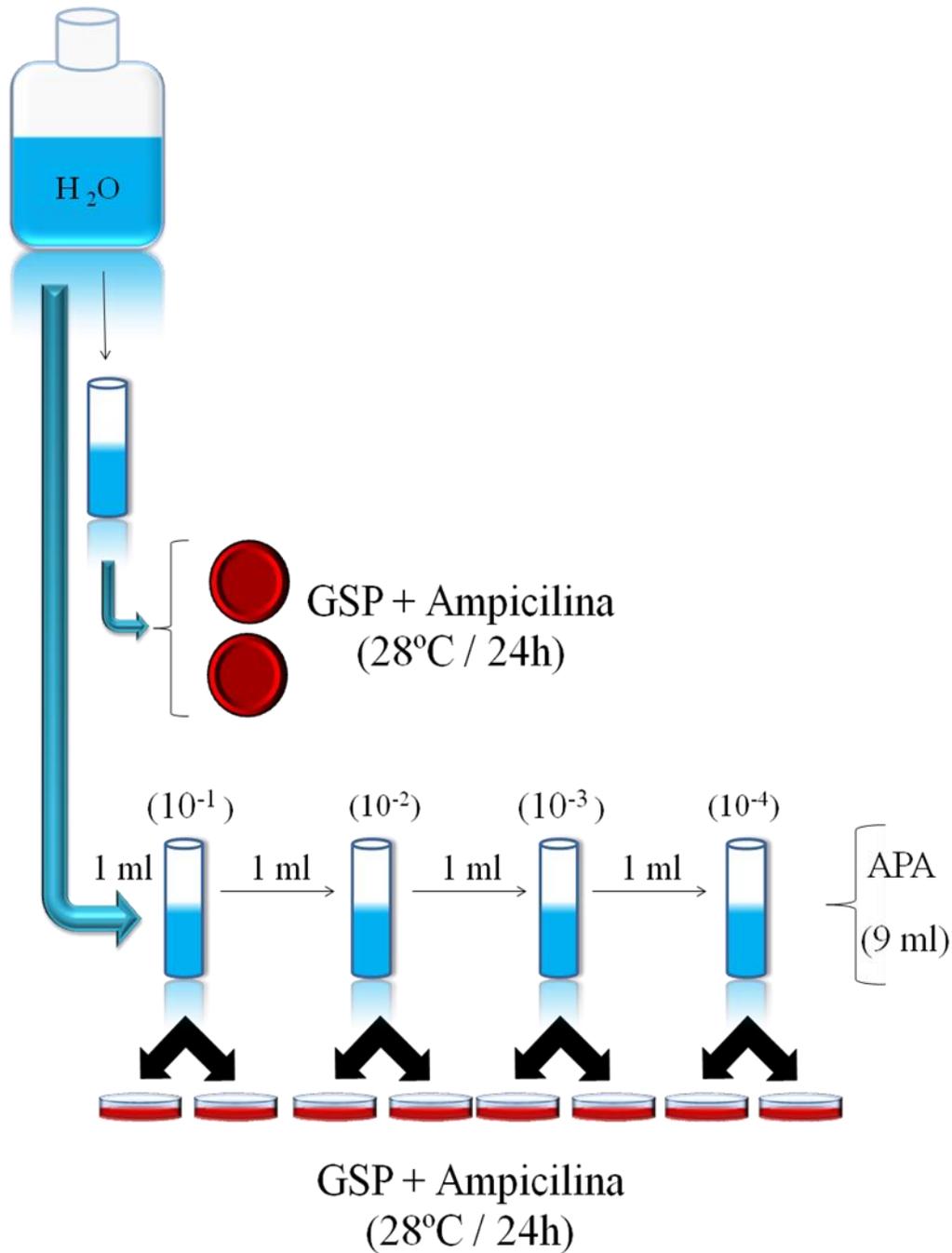
### 4.1.1. Amostras de água

A partir das amostras de água foram preparadas diluições decimais sucessivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) em Água Peptonada Alcalina (APA). De cada diluição foram tomadas alíquotas de 100  $\mu$ L (0,1 mL) e pelo método de espalhamento, usando alça de Drigalski, eram distribuídas, em duplicata, na superfície do meio seletivo Agar Gelatina Fosfato Sal (Agar GSP) (Merck) acrescido de 20  $\mu$ g/mL do antibiótico ampicilina. As placas eram então incubadas invertidas em estufa, onde permaneciam a 28°C por 24 h (HUGUET et al., 1991). Para a determinação qualitativa de *Aeromonas* foram semeados 10 mL de água em 10 mL de APA, de acordo com Matté (1995) e incubadas a 28°C por 24 h sendo então plaqueadas, em duplicata, na superfície do ágar GSP, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo (teste de presença/ausência) (Figura 13).

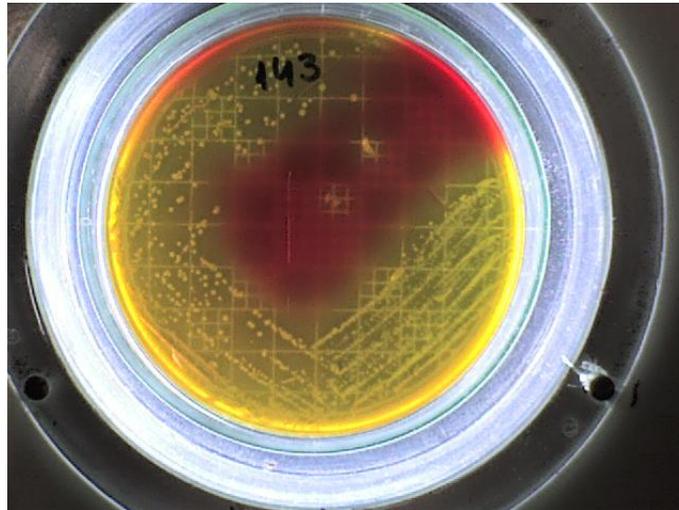
Decorrido o período de incubação, as colônias crescidas nas placas contendo um número entre 25 e 250 eram contadas através do método de Contagem Padrão em Placas (CPP) (DOWNES; ITO, 2001). Transcorrida a contagem, eram isoladas de 2 a 3 colônias típicas, ou seja, amarelas, devido à produção de amilase, com halo claro de 2 a 5 mm de largura ao redor da colônia (Figura 14). As colônias isoladas eram então transferidas para o meio contendo ágar TSA (Difco) e os tubos eram incubados em estufa a 28°C por 24 h. Após

esse período culturas puras eram então devidamente identificadas através de testes bioquímicos (MATTÉ, 1995).

## Isolamento de *Aeromonas* na água



**Figura 13.** Esquema representativo utilizado para isolamento de *Aeromonas* nas amostras de água coletada em três diferentes pontos do rio Cocó, CE.



**Figura 14.** Placa contendo o Agar GSP com crescimento característico de *Aeromonas*.

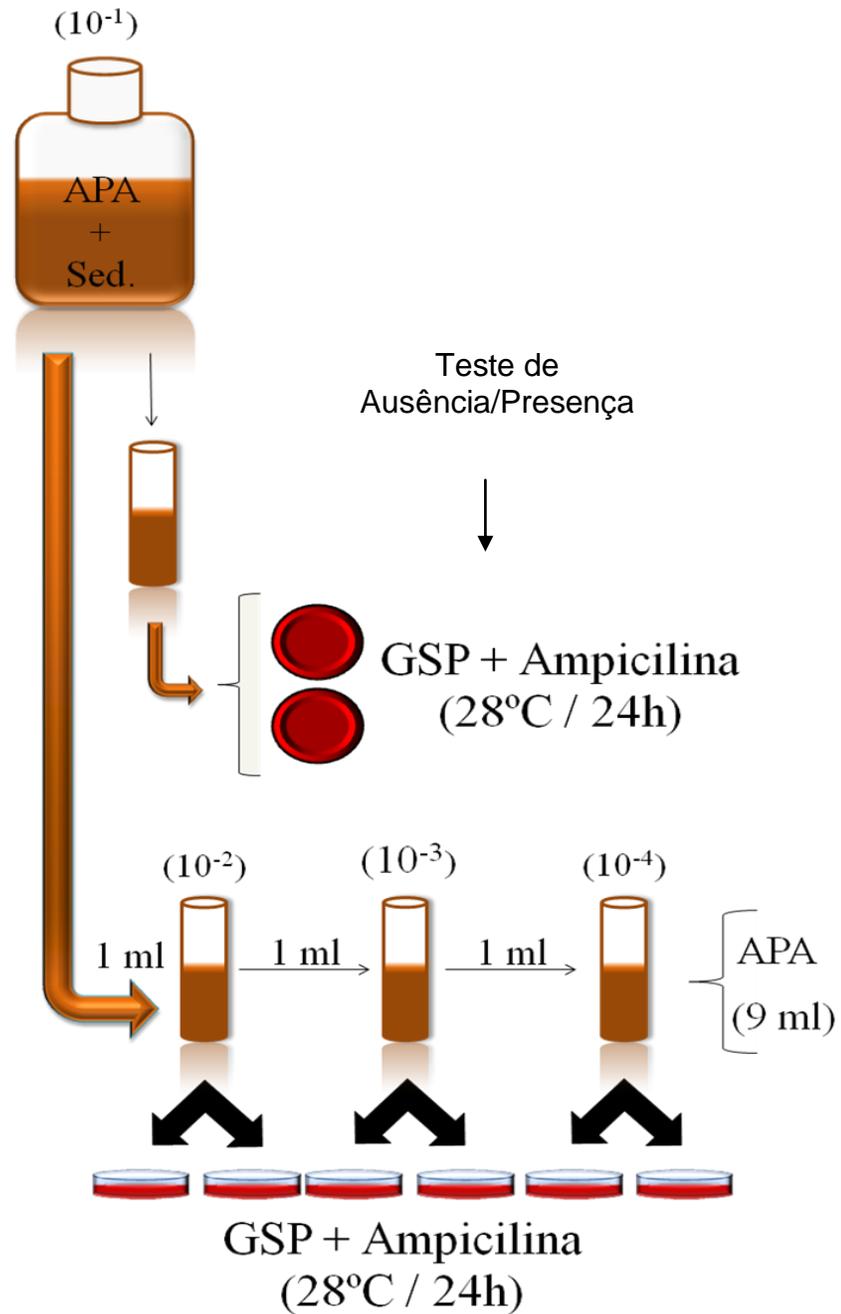
#### **4.1.2. Amostras de sedimento**

Para a análise do sedimento, foram pesadas, assepticamente, 25 g da amostra em uma placa de Petri estéril e em seguida transferida para um Erlenmeyer contendo 225 mL de Água Peptonada Alcalina (APA) esterilizada, sendo então homogeneizada em agitador magnético por 30 minutos. A partir do homogenato (diluição  $10^{-1}$ ) seguiram-se as demais diluições, até  $10^{-4}$ . De cada diluição foram tomadas alíquotas de 100  $\mu$ L (0,1 mL) e pelo método de espalhamento, usando-se alça de Drigalski, foram distribuídas, em duplicata, na superfície do meio seletivo Agar GSP (Merck) acrescidos de 20  $\mu$ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas, invertidas, em estufa, onde permaneceram a 28°C por 24 h (HUGUET et al. 1991). Para a determinação qualitativa de *Aeromonas* foram semeados 10 mL do sedimento em suspensão em 10 mL de APA, de acordo com Matté (1995) e os tubos foram incubados a 28°C por 24 h.

Após esse período forma espalhados inóculos em placas com ágar GSP, utilizando-se alça de níquel-cromo (teste presença/ausência) (Figura 15).

A Contagem Padrão em Placas (CPP) e a identificação bioquímica das cepas seguiram a metodologia descrita acima. Para o cálculo do número presuntivo de UFC/mL ou g (Unidades Formadoras de Colônias) de *Aeromonas* sp., multiplicou-se o número de colônias típicas contadas, pelo inverso da diluição escolhida.

## Isolamento de *Aeromonas* no sedimento



**Figura 15.** Esquema representativo utilizado para isolamento de *Aeromonas* nas amostras de sedimento coletadas em três diferentes pontos do rio Cocó, CE.

#### 4.1.3. Identificação das cepas suspeitas de *Aeromonas sp.*

As colônias suspeitas de *Aeromonas* foram semeadas em tubos contendo Agar Tripticase Soja (Agar TSA) inclinado, seguido de incubação a 28°C por 24 h. Decorrido esse período, as culturas em ágar TSA foram submetidas aos seguintes testes presuntivos: teste em Agar Tríplice Açúcar e Ferro (Agar TSI), teste em ágar AGS, resistência ao O/129, oxidase e catalase, de acordo com Harf-Monteil et al. (2004).

- **Teste em Agar Tríplice Açúcar e Ferro (Agar TSI):**

Para este teste as cepas foram inoculadas por picada em profundidade e em estrias com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo, em tubos contendo o Agar Tríplice Açúcar e Ferro (Agar TSI) com uma parte inclinada e outra em coluna. O período de incubação foi de 24-48 h a 28°C. O teste positivo era caracterizado pela acidificação do meio no ápice (sacarose +) e acidificação na base (glicose +). A produção de gás pode ocorrer ou não (Figura 16).



**Figura 16.** Tubos contendo o meio TSI (Agar Tríplice Açúcar e Ferro) representando positividade para *Aeromonas sp.*(A – positivo, B – negativo).

- **Teste em Agar Gelatina Fosfato Sal (Agar AGS):**

Nesse teste, as cepas foram inoculadas por picada em profundidade com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, em tubos contendo o Agar Gelatina Fosfato Sal (Agar AGS). O período de incubação foi de 24 - 48 h a 28°C. O crescimento positivo nos tubos era dado pela alcalinidade do meio (sem mudança de coloração na rampa e na base). A produção de gás pode ocorrer ou não (Figura 17).

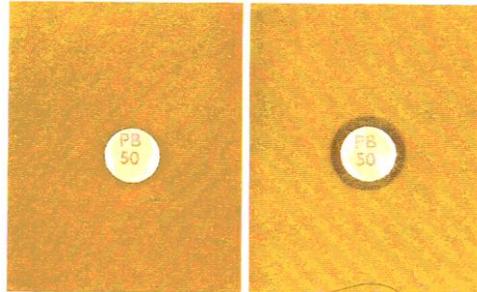


**Figura 17:** Tubo contendo o meio AGS (Agar Gelatina Fosfato Sal) representando positividade para *Aeromonas sp.*

- **Teste de resistência ao O/129:**

Foram estriados, com o auxílio de uma alça de platina, inóculos das cepas suspeitas em placas contendo Agar Muller Hinton. Em seguida, discos de papel de filtro impregnados com 10 e 150 µg/mL do agente vibriostático O/129 eram depositados, na superfície do agar, com o auxílio de uma pinça flambada. As placas eram então, incubadas a 28°C por 24 h. O teste era considerado positivo quando se observava o crescimento de *Aeromonas* em toda a superfície da placa,

sem a presença de halo de inibição ao redor dos discos. A bactéria é resistente às duas concentrações desse agente (Figura 18).



**Figura 18.** Teste de sensibilidade ao agente vibriostático O/129, mostrando *Aeromonas sp.* resistente às duas concentrações.

- **Teste de oxidase:**

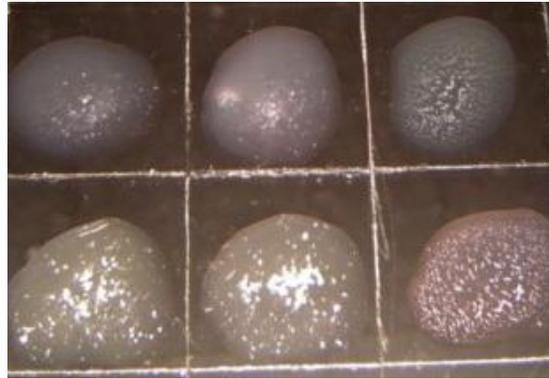
A partir da cultura em Agar TSA, uma pequena porção do crescimento era transferida, por meio de uma alça de platina, para um papel de filtro embebido com o reagente para oxidase. Logo a seguir realizava-se a leitura. A prova era considerada positiva mediante a produção de coloração violeta na região do papel de filtro contendo o inóculo (Figura 19).



**Figura 19.** Demonstração do teste de oxidase, sendo a placa da direita positiva.

- **Teste da catalase:**

A partir do crescimento de 24 horas em Agar TSA uma pequena porção da cultura era transferida para uma lâmina de vidro limpa, com o auxílio de uma alça de platina. Em seguida, a cultura era coberta com uma gota de água oxigenada a 3,0%. A prova positiva era revelada através da liberação de bolhas. As cepas que apresentavam positividade frente a esta prova, eram consideradas suspeitas de *Aeromonas* e então se procedia as identificações definitivas (Figura 20).



**Figura 20.** Teste da catalase positiva para *Aeromonas* sp.

As colônias que apresentavam positividade para o gênero *Aeromonas* nos testes presuntivos eram então submetidas às provas bioquímicas complementares para confirmação até espécie: produção de gás a partir da glicose; prova de Indol, motilidade; prova de Voges-Proskauer (VP); descarboxilação de aminoácidos e fermentação de carboidratos (Figura 21).

- **Produção de gás a partir da glicose:**

As cepas eram semeadas em tubos contendo caldo vermelho de fenol e 0,5% de D-glicose e tubos de Durham invertidos. Após incubação por 24 h a 28°C, eram considerados positivos os testes que apresentassem cor amarela, devido à acidificação a partir da fermentação da glicose e presença de gás no interior do tubo de Durham.

- **Produção de Indol:**

Neste teste, as cepas foram semeadas em tubo contendo o meio semi-sólido SIM. Após incubação por 24 h a 28°C, adicionou-se, cuidadosamente, algumas gotas do reativo de Kovacs. O teste positivo era revelado pela formação de um anel púrpura/vermelho na superfície do meio.

- **Motilidade:**

Com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo, realizou-se este teste inoculando-se a cepa em meio semi-sólido SIM, até  $\frac{3}{4}$  de sua altura. Em seguida, os tubos eram incubados a 28°C por 24 h. Após o período de incubação, fazia-se a leitura do teste. O resultado era considerado positivo pela turvação do meio e pela migração da bactéria a partir da linha inoculada.

- **Prova de Voges-Proskauer:**

As cepas eram inoculadas em tubos contendo o caldo MR-VP; em seguida eram incubados em estufa bacteriológica a 28°C por até 96 h. Após este período,

adicionava-se a 1 mL da cultura, 0,6 mL de uma solução de  $\alpha$ -naftol e 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio a 40%, agitava-se levemente, deixando a cultura em contacto com o  $O_2$  atmosférico. A prova era considerada positiva quando os tubos apresentavam uma coloração vermelha.

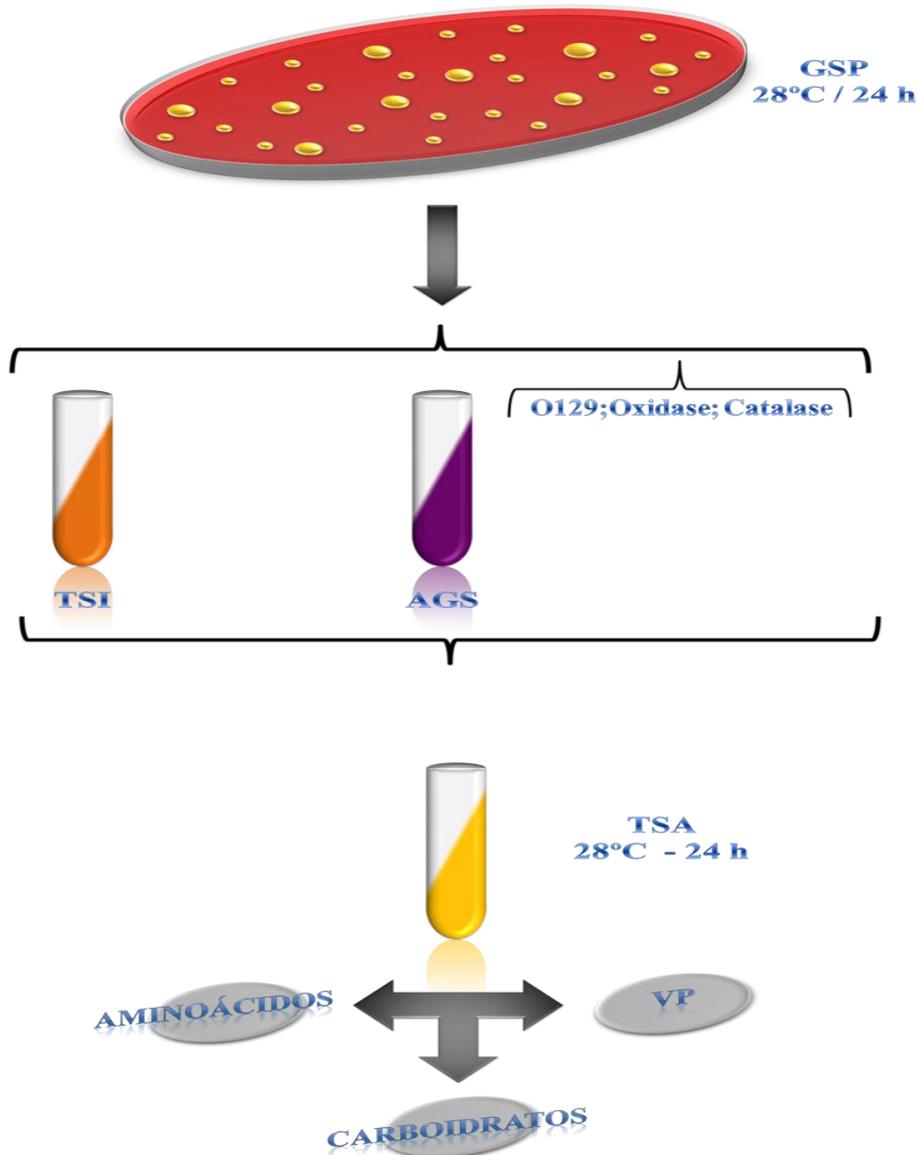
- **Fermentação de carboidratos:**

As cepas eram inoculadas em tubos com o caldo vermelho de fenol acrescido dos açúcares na concentração de 0,5%: arabinose, sacarose, lactose, manitol, salicina. Em seguida os tubos eram incubados a 28°C por 24-48 h. A positividade dos testes era confirmada pela mudança da cor de vermelha para amarela em função da acidificação do meio.

- **Descarboxilação de aminoácidos:**

Neste teste cada cepa era inoculada em tubos contendo o meio base (Caldo Vermelho de Fenol) acrescido de 0,5% de lisina, arginina e ornitina, respectivamente. Em seguida todos os tubos recebiam uma camada de óleo mineral estéril e em seguida eram incubados a 28°C por até 96 h. A prova era considerada positiva, quando a cor do meio permanecia inalterada (violeta), devido a descarboxilação das aminas, ocorrendo a neutralização do pH ácido, causado pela degradação da glicose. No teste negativo o meio base alterava a cor para amarelo, devido a utilização da glicose.

## Identificação de *Aeromonas* isoladas de água e sedimento do rio Cocó, CE.



**Figura 21.** Esquema representativo utilizado para identificação de *Aeromonas* spp. isoladas de água e sedimento do rio Cocó, CE.

#### **4.1.4. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (Teste de Kirby - Bauer)**

O antibiograma das cepas de *Aeromonas* foi realizado pelo método de difusão em placa (BAUER et al., 1966), seguindo-se a metodologia proposta por Kirby - Bauer, segundo a orientação técnica ditada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) envolvendo o uso dos seguintes antibióticos comerciais: ampicilina (AMP) (10 µg), tetraciclina (TET) (30 µg), penicilina (PEN) (10 UI), cefalotina (CFL) (30 µg), ceftriaxona (CRO) (30 µg), ácido nalidíxico (NAL) (30 µg), cloranfenicol (30 µg) (CLO), eritromicina (ERI) (15 µg), vancomicina (VAN) (30 µg).

Os discos antimicrobianos estavam mantidos sob refrigeração à temperatura de 2 a 8°C, sendo utilizados dentro do prazo de validade. Antes de serem testados, foram deixados à temperatura ambiente por aproximadamente duas horas.

As colônias, uma vez identificadas como *Aeromonas* foram renovadas para um tubo de TSA e após 24 h de incubação a 28°C, o crescimento estava adequado para a realização do antibiograma. Uma alçada era transferida e inoculada em tubos contendo 9 mL de solução salina estéril a 0,85%, até obtenção do padrão de densidade óptica da escala de McFarland de 0,5, utilizando-se espectrofotômetro (Micronal B542).com leitura feita no comprimento de onda de 600nm. Esta turvação representa uma concentração bacteriana de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) (TRABULSI, ALTERTHUM, 2005) (Figura 22).

Das soluções ajustadas foram retiradas inóculos com emprego de “swab” estéril e semeados em placas de Petri contendo Ágar Muller-Hinton. Os discos

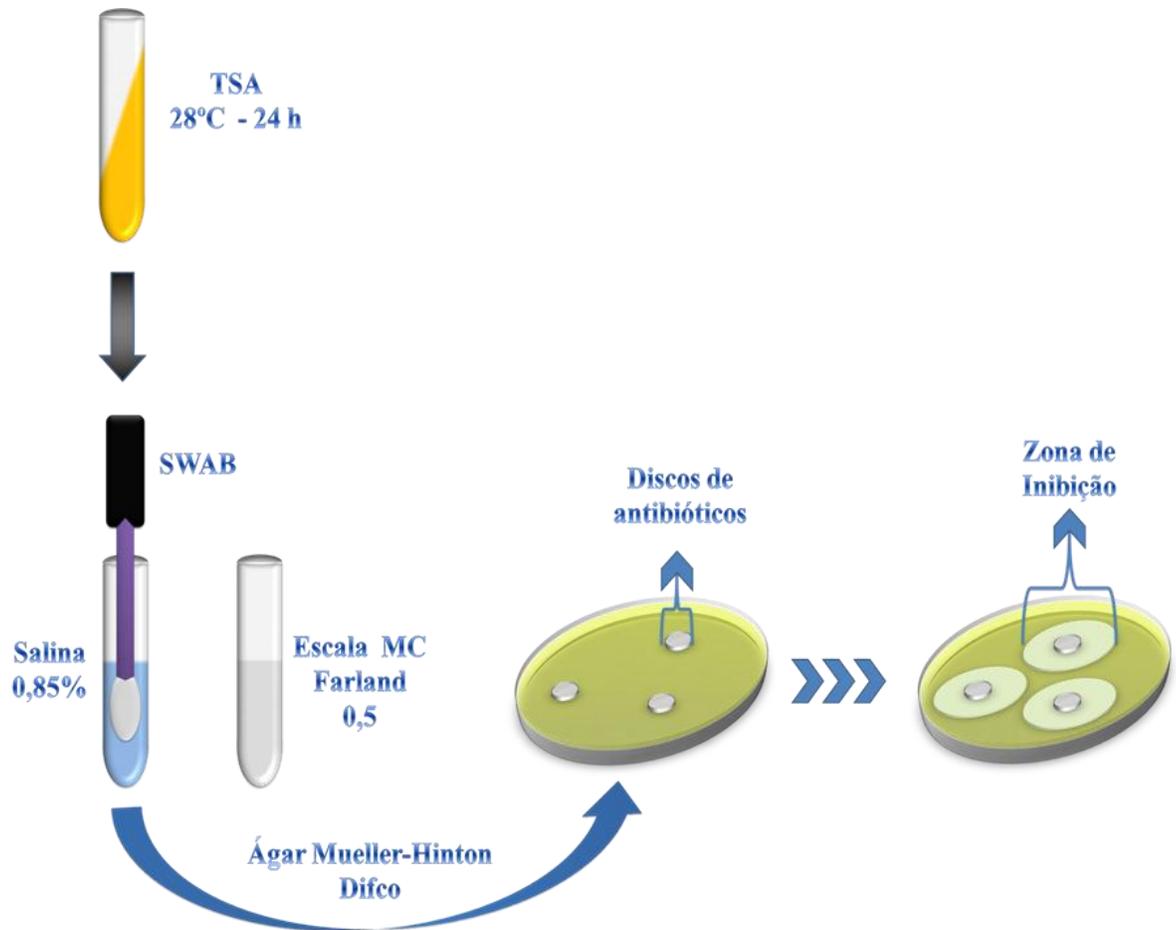
impregnados de antibióticos eram aplicados na superfície do meio com o auxílio de uma pinça flambada e então levemente pressionados no meio. Após o período de incubação procedeu-se à leitura das placas medindo-se, em milímetros, o diâmetro da zona de inibição do crescimento das colônias. As cepas eram caracterizadas como resistentes, de sensibilidade intermediária ou sensível de acordo com uma tabela de mensuração dos halos para cada antimicrobiano usado, fornecido pelo fabricante dos discos impregnados (Tabela 3).

**Tabela 3.** Padrão de interpretação do teste de difusão com medidas dos halos e resultados para sensibilidade, resistência e comportamento intermediário das cepas testadas frente aos antimicrobianos escolhidos.

<b>Antibiótico</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Conc. Discos</b>	<b>Resistente</b>	<b>Intermediário</b>	<b>Sensível</b>
Ác.nalidíxico	NAL	30 mcg	≤ 13	14 a 18	≥19
Ampicilina	AMP	10 mcg	≤ 13	14 a 16	≥17
Cefalotina	CFL	30 mcg	≤ 14	15 a 17	≥18
Ceftriaxona	CRO	30 mcg	≤ 13	14 a 20	≥21
Cloranfenicol	CLO	30 mcg	≤ 12	13 a 17	≥18
Eritromicina	ERI	15 mcg	≤ 13	14 a 22	≥23
Tetraciclina	TET	30 mcg	≤ 11	12 a 14	≥15
Vancomicina	VAN	30 mcg	≤ 14	15 a 16	≥17

Fonte: CECON (2003).

## Fluxograma do Antibiograma

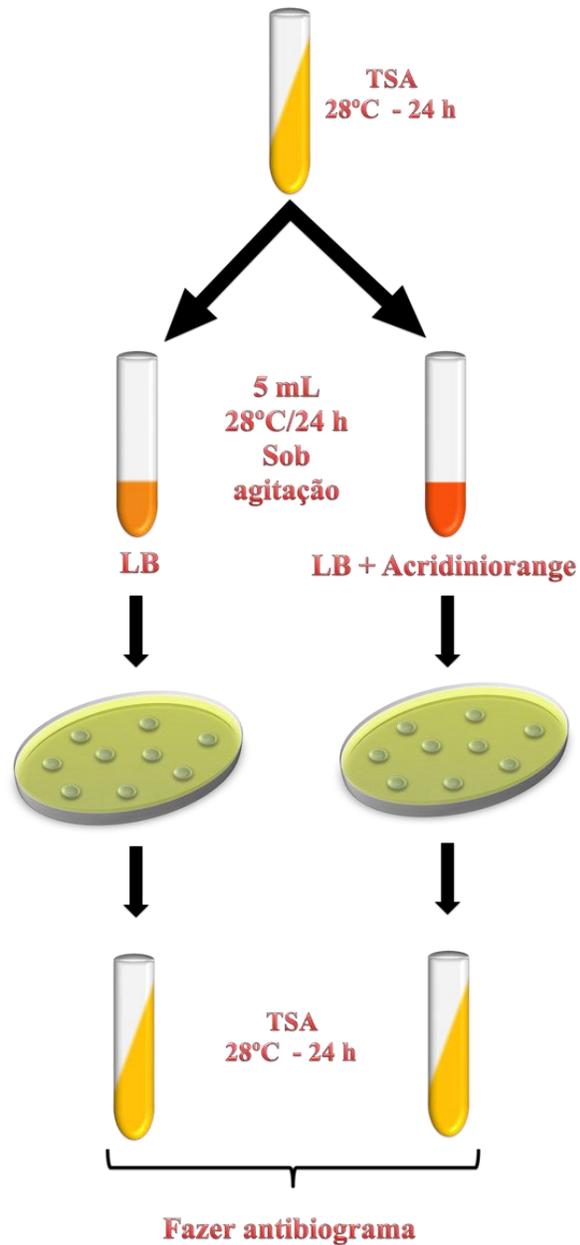


**Figura 22.** Esquema representativo utilizado para a realização do antibiograma das cepas de *Aeromonas* isoladas de água e sedimento do Rio Cocó, CE.

#### **4.1.5. Cura de plasmídio**

As cepas com perfil de resistência múltipla frente aos antimicrobianos testados foram submetidas a um processo de “cura” de plasmídio tendo como agente o Acridine Orange (AO) nas concentrações de 100 µg/mL. As cepas foram crescidas em Agar Tripticase Soja (Agar TSA) (24h/30°C). Após esse período de tempo, inóculos foram adicionados aos tubos contendo caldo Luria Bertani (LB) (controle) e aos tubos contendo caldo LB + AO que foram logo em seguida incubados em banho-maria sob agitação constante (24h/30°C). As culturas crescidas nesses caldos foram submetidas novamente ao teste de antibiograma frente aos antibióticos aos quais haviam apresentado resistência anteriormente para verificar alteração no perfil de resistência (MOLINA-AJA et al., 2002) (Figura 23).

## Fluxograma da Cura do Plasmídio



**Figura 23.** Esquema representativo utilizado para a realização da cura do plasmídio das cepas de *Aeromonas* multiresistentes isoladas de água e sedimento do Rio Cocó, CE.

## 5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 4 e 5 são apresentados os resultados da análise das 60 amostras ambientais coletadas no Rio Cocó. A CPP de *Aeromonas* típicas na água variou de 10 UFC/mL a 7.050 UFC/mL no ponto A; de 25 UFC/mL a 38.500 UFC/mL no ponto B; e para o ponto C as contagens foram menores que 10. Para o sedimento a CPP de *Aeromonas* sp no estuário do Rio Cocó variou de 100 UFC/est./g a 37.500 UFC/g no ponto A; de 1.200 UFC/g a 43.500 UFC/g no ponto B; e as contagens no ponto C foram menores que 10.

**Tabela 4:** Contagem padrão em placas (CPP) em UFC/mL em amostras de água coletadas no estuário do Rio Cocó, Ce, no período de outubro de 2007 a abril de 2008.

Coleta	CPP (UFC/mL)		
	PA	PB	PC
1 <sup>a</sup>	90*	95*	<10
2 <sup>a</sup>	3.900	285	<10
3 <sup>a</sup>	10*	25*	<10
4 <sup>a</sup>	815	490	<10
5 <sup>a</sup>	40*	44	<10
6 <sup>a</sup>	365	1.180	<10
7 <sup>a</sup>	25*	160	<10
8 <sup>a</sup>	335	235*	<10
9 <sup>a</sup>	565	435	<10
10 <sup>a</sup>	7.050	38.500	<10

\*UFC/mL estimada

**Tabela 5:** Contagem padrão em placas (CPP) em UFC/g em amostras de sedimento coletadas no estuário do Rio Cocó,Ce, no período de outubro de 2007 a abril de 2008.

Coleta	CPP (UFC/g)		
	PA	PB	PC
1 <sup>a</sup>	5.500*	11.500*	<10
2 <sup>a</sup>	750	24.500	<10
3 <sup>a</sup>	1.500*	<10	<10
4 <sup>a</sup>	100*	200	<10
5 <sup>a</sup>	500*	<10	<10
6 <sup>a</sup>	9.750	4.750	<10
7 <sup>a</sup>	5.600	1.200	<10
8 <sup>a</sup>	14.000	25.000*	<10
9 <sup>a</sup>	3.000	2.500	<10
10 <sup>a</sup>	37.500	43.500	<10

\*UFC/mL estimada

Pode-se observar que na décima coleta ocorreram as maiores contagens de *Aeromonas* sp, oscilando entre 7.050 e 38.500 UFC/mL para água e de 37.500 a 43.500 UFC/g para o sedimento. Enquanto que no ponto C ocorreram as menores contagens para água. Para o sedimento as menores contagens ocorreram também no ponto C. Para os pontos A e B as menores contagens ocorreram na terceira e quinta coletas, respectivamente.

É possível que os altos índices de *Aeromonas* tenham ocorrido pelo fato de que a décima coleta aconteceu no mês de abril de 2008, período chuvoso, fator que favorece o aumento de matéria orgânica trazida pela lixiviação, e diminuição

da salinidade (fator limitante para proliferação de *Aeromonas*) pela a ação das chuvas.

A terceira e quarta coletas foram realizadas no mês de setembro, período de seca, o que, possivelmente, explica a redução da contagem de *Aeromonas*, pois ocorre uma diminuição da intensidade de chuvas acompanhada pelo aumento da temperatura e salinidade. Resultados semelhantes a esses foram encontrados por Martins (2005) ao estudar a distribuição de *Aeromonas* no estuário do Rio Bacanga em São Luiz, Maranhão, quando foram obtidas maiores contagens no mês de abril,  $3,0 \times 10^7$  UFC/mL, e as menores no mês de outubro  $4,6 \times 10^2$ . O fato de o ponto C estar mais próximo da praia e possuir, portanto, uma maior salinidade pode ter contribuído para uma contagem menor que dez, tanto na água quanto no sedimento para este ponto.

Marcel et al. (2002) isolaram e caracterizaram espécies de *Aeromonas* do lago Ebrié, Abidjan, Costa do Marfim e também obtiveram as maiores contagens na estação chuvosa quando a salinidade era baixa e as menores nos meses mais secos, com salinidade acima de 10‰.

Seidler et al. (1980) em um estudo com o objetivo de enumerar e isolar bactérias do gênero *Aeromonas* na água e no sedimento de um rio situado no Estado de Washington DC, Estados Unidos, observaram que a maior contagem de *Aeromonas* ocorreu no período em que a temperatura da água era mais elevada. As contagens máximas obtidas em seu estudo foram de  $4,0 \times 10^5$  UFC/g no sedimento e de 300 UFC/mL na água.

Além da água o solo pode ser uma importante fonte de contaminação por *Aeromonas*, como sugere Brandi et al. (1996), que ao estudarem a sobrevivência

de cepas de *Aeromonas* em solo rico e pobre de microflora indígena puderam notar que as cepas de *Aeromonas* foram capazes de sobreviver nos dois tipos de solo analisados. No entanto, Rocha (2004) ao estudar a ocorrência de *Aeromonas* em lagoas de estabilização no município de Lins, São Paulo, observou que os parâmetros físico-químicos analisados não faziam correlação com a presença de *Aeromonas* sp.

Sautour et al. (2003) estudaram o efeito da temperatura, da atividade de água e do pH no crescimento de *Aeromonas hydrophila* e sua sobrevivência em água, e concluíram que os principais fatores que influenciam na atividade de crescimento dessa bactéria é a temperatura, sendo o pH o fator de menor significância.

Vários fatores ambientais (matéria orgânica, nutrientes inorgânicos, oxigênio dissolvido, pH, salinidade, temperatura, etc.) agem nos ecossistemas aquáticos, influenciando não somente na quantidade e na composição da microbiota, mas também na morfologia e fisiologia dos microrganismos (FIORENTINI et al., 1998). Os resultados referentes às medidas dos parâmetros físico-químicos medidos, das amostras de águas superficiais do estuário do rio Cocó estão dispostos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros físico-químicos (pH, salinidade e temperatura) dos pontos de amostragem A, B e C das águas do Rio Cocó, Fortaleza-CE, no período de outubro de 2007 a abril de 2008.

	pH			Salinidade‰			Temperatura °C		
	Ponto A	Ponto B	Ponto C	Ponto A	Ponto B	Ponto C	Ponto A	Ponto B	Ponto C
1ª coleta	7,6	7,5	8,1	0	0	36	27	26	27
2ª coleta	7,7	7,5	8,1	0	0	37	27	26	27
3ª coleta	7,4	7,4	8	0	0	39	26	27	27
4ª coleta	7,6	7,5	7,9	0	0,3	35	25	27	27
5ª coleta	7,7	7,6	8,1	0	0	36	27	28	29
6ª coleta	7,6	7,6	7,8	0	0	32	27	26	27
7ª coleta	7,7	7,6	7,9	0	0	32	29	28	29
8ª coleta	7,7	7,5	7,7	0	0	35	29	28	28
9ª coleta	7,2	7,2	8,2	0	0	35	29	29	31
10ª coleta	7	7,1	7,5	0	0	36	29	29	30

Para o pH, os valores variaram entre 7,0 e 8,2, havendo uma tendência maior para a alcalinidade. O mês de outubro foi o que apresentou os maiores valores de pH e o de abril, os menores.

Mattè (1995) relatou que valores de pH entre 5,5 e 9,0 não só favorecem a sobrevivência, mas também a multiplicação de *Aeromonas* sp. No presente estudo foram registrados valores de pH entre 7,2 e 8,2, ao longo do estuário indicando que este fator é favorável ao desenvolvimento desses organismos.

Em relação à temperatura pode-se observar que não houve variações significativas nos meses de coleta, sendo obtidas temperaturas ideais e favoráveis ao crescimento e proliferação de *Aeromonas*.

Segundo Melo et al. (1990), a temperatura é um fator de fundamental importância uma vez que sua elevação provoca um aumento considerável no

número de microrganismos, quando a água contém pequena quantidade de elementos nutritivos.

No que diz respeito ao fator salinidade este sofreu pouca variação durante os meses de coleta, figurando como o principal fator limitante neste trabalho, divergindo dos resultados de Martins (2005), que encontrou os menores valores de salinidade (4,1 a 7,8‰) no mês de abril, meses de chuva; e os maiores valores foram obtidos em outubro (23,1 a 27,4‰), período de estiagem.

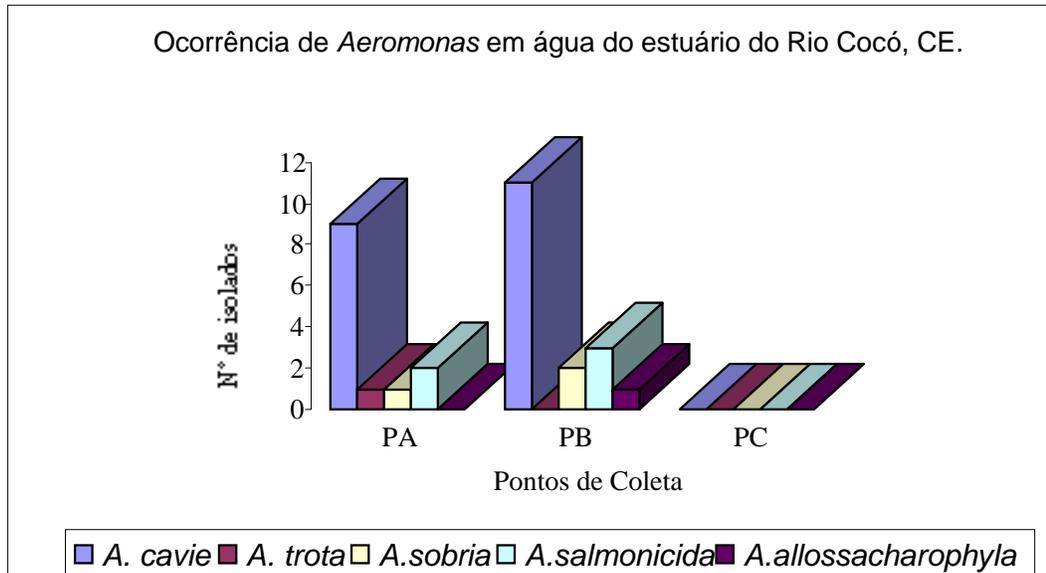
Rael e Frankenberger (1996) estudaram a influência do pH, salinidade e selênio no crescimento de *Aeromonas veronii* na água de drenagem de uma agricultura, em Fresno County, Califórnia, e concluíram que a salinidade pareceu ser o fator mais limitante do estudo por eles realizado.

Quando analisadas em seu conjunto, a temperatura, o pH e a salinidade, demonstram a existência de condições ambientais extremamente propícias para ocorrência e multiplicação de *Aeromonas* para os pontos de coleta A e B.

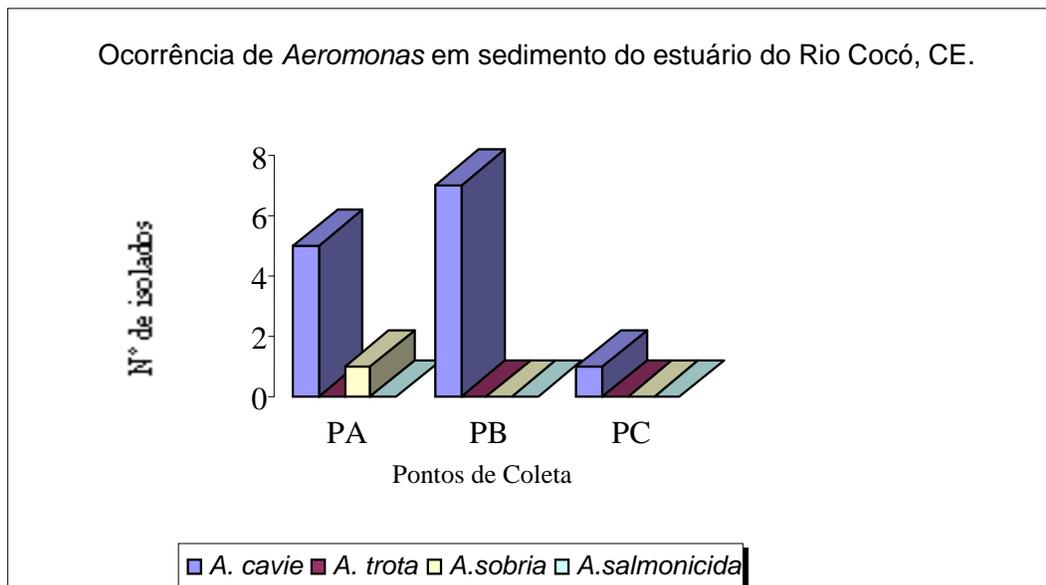
Diversos estudos demonstram que as características bioquímicas desse gênero podem variar de acordo com a fonte de isolamento, e mesmo com características geográficas, favorecendo uma variabilidade de resultados dos testes e dificultando o posicionamento taxonômico dos isolados (JOSEPH; CARNAHAM; 2000).

No presente estudo foram isoladas 120 cepas suspeitas de *Aeromonas* sendo que 34,1%(41) cepas foram identificadas até espécie. Das espécies identificadas, 37,7% (17) foram isoladas do ponto A: 24,4%(11) da água e 13,3%(6) do sedimento; 51,1% (23) foram isoladas do ponto B: 40%(18) da água e

11,1%(5) do sedimento; e do ponto C foi isolada apenas 2,2% correspondendo a uma estirpe proveniente do sedimento (Figuras 23 e 24).



**Figura 24:** Ocorrência de *Aeromonas* em água de três pontos distintos do Rio Cocó, CE.

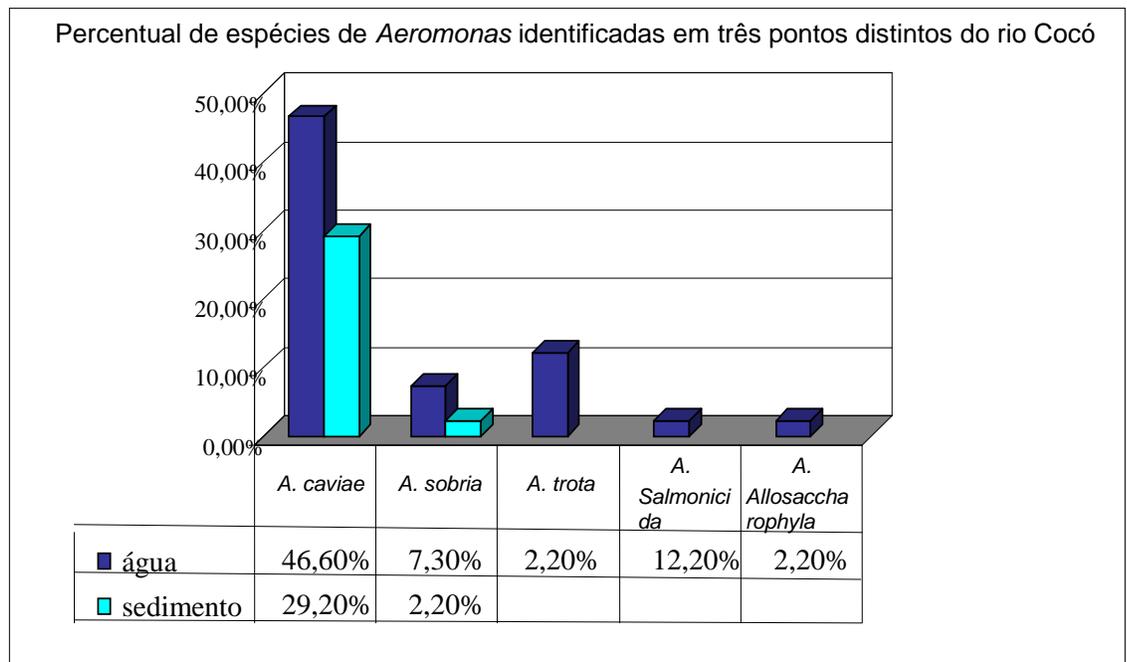


**Figura 25:** Ocorrência de *Aeromonas* em sedimento de três pontos distintos do Rio Cocó, CE.

O ponto B é o mais próximo da cidade, local onde se observa um maior impacto ambiental devido a proximidade com o shopping Iguatemi, motivo que pode ter favorecido a ocorrência de um maior número de isolados nesse local de coleta.

Durante os meses de amostragem foram isoladas e identificadas as espécies *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas trota*, *Aeromonas salmonicida* e *Aeromonas allossacharophyla*. É importante ressaltar que de um mesmo ponto foi isolado mais de um tipo de *Aeromonas* (Figuras 24 e 25).

Dentre as espécies de *Aeromonas* isoladas das amostras de água constatou-se que *A. caviae* teve frequência de 46,6%, *A. sobria* de 7,3%, *A. salmonicida* de 12,2%, *A. trota* de 2,2% e *A. allossaccharophyla* de 2,2%, do total das cepas testadas. Em relação às amostras de sedimento a espécie mais freqüente também foi *A. caviae* com 29,2%, seguida por *A. sobria* com 2,2% do total de isolados (Figura 26).



**Figura 26:** Percentual de espécies de *Aeromonas* sp. identificadas em três pontos distintos do Rio Cocó, CE.

Leitão e Silveira (1991) encontraram uma positividade de 77% para *Aeromonas* spp, ao usarem o mesmo método de análise em diferentes tipos de amostra: água e pescado de origem marinha, e água e peixes de rios e hortaliças. No entanto, esses autores observaram maior frequência da espécie *Aeromonas hydrophila*, em discordância com os resultados obtidos neste estudo.

De acordo com Turnbull et al. (1984) e Araújo et al. (1991), *Aeromonas caviae* é a espécie mais encontrada em água doce, no entanto, Matté et al. (1995), ao analisarem 64 amostras de água de superfície e 24 de sedimento da Represa de Guarapiranga em São Paulo, verificaram que em 76,6% das amostras foram isoladas *Aeromonas jandaei*, em 43,7% *Aeromonas sobria*, em 31,2% *Aeromonas caviae* e em 18,7% *Aeromonas hydrophila*.

Evangelista-Barreto et al. (2006) ao isolarem *Aeromonas* de ostras coletadas em um berçário natural no estuário do Rio Cocó, obtiveram 67% de positividade para *Aeromonas*. A presença desse patógeno em moluscos pode representar um indicador de contaminação fecal, tendo em vistas que esses animais são filtradores (ARAÚJO et al., 1991). Ormem e Ostenovik (2001) fazem referência ao aumento do risco de infecção humana através da exposição direta de feridas ao ambiente contaminado, ou ao consumo de alimentos, principalmente aqueles que são consumidos *in natura*.

Rocha (2004) ao estudar a ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no município de Lins, SP, também conseguiu isolar uma grande variedade de espécies, entre as quais estão *A. caviae*, *A. allossacharophyla* e *A. trota*, espécies também relatadas no presente estudo.

Estudos realizados por Brandi et al. (1996) constataram que o solo pode representar uma importante reserva de *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, assim como foi confirmada nesta pesquisa.

Muito embora a espécie *Aeromonas hydrophila* seja a mais preocupante em termos de patogenicidade, não se deve esquecer que *Aeromonas caviae*, isolada de todas as amostras estudadas, também produz fatores de virulência, sendo tidas como as principais patogênicas ao homem (BUCHANAN; PALUMBO, 1985). Gautam et al. (1992) afirmam que a *A. caviae* tem menor patogenicidade, mas em algumas áreas geográficas tem grande importância por estar associada a casos de diarreia.

Rossi Júnior et al. (1996) ressaltam a grande preocupação que passou a ser dispensada às bactérias do gênero *Aeromonas* spp, por serem capazes de estabelecer diferentes tipos de patogenias que acometem tanto animais quanto homens.

Os resultados referentes à susceptibilidade a antimicrobianos comerciais, das cepas de *Aeromonas* isoladas de água e sedimento do Rio Cocó, são apresentados na Tabela 7, constatando-se que as cepas de *Aeromonas* testadas mostraram-se resistentes a ampicilina. Geralmente, essa resistência pode estar relacionada à produção natural pelas *Aeromonas* de  $\beta$  - lactamases, as quais hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico, tornando-o inativo (FOSSE et al., 2003).

Segundo Santos et al. (2003), o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$  – lactâmicos tem sido associado, em grande parte, à disseminação das (Beta – lactamases de Espectro Estendido) ESBL. A resistência bacteriana decorrente da produção de ESBL pode também ser induzida durante a terapêutica, criando-se um problema independente do procedimento laboratorial.

Resistência bacteriana é um conjunto de mecanismos pelos quais microrganismos adquirem imunidade a um ou a mais antimicrobianos (CHIQUITO; MONTIANI, 1997) em virtude da seleção genética, induzindo a uma rápida propagação de genes com resistência a múltiplas drogas, atingindo outras bactérias que não foram expostas ainda aos antimicrobianos (MORIARTY,1999).

O índice de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos no ambiente aquático tem aumentado desde a década de 70, no século passado. Este é resultante do seu uso indiscriminado na profilaxia ou terapêutica humana e animal

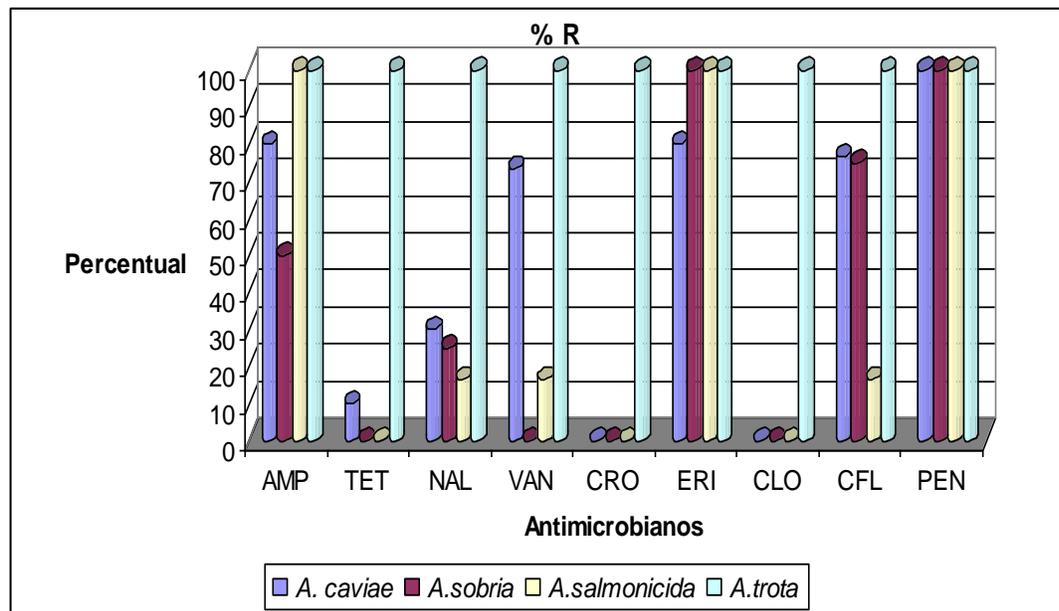
ou ainda na implementação da produção de alimento. Esse aumento é consequência também da disseminação de plasmídios, que possuem genes de resistência, proporcionando uma maior flexibilidade genética em populações microbianas para adaptações e sobrevivência em ambientes hostis (CARDONHA et al., 2005).

**Tabela 7:** Perfil da susceptibilidade aos antimicrobianos das 41 cepas de *Aeromonas* isoladas da água e do sedimento de três pontos distintos do Rio Cocó, CE.

Antibióticos	Nº. (%) susceptibilidade a								
	AMP	TET	NAL	VAN	CRO	ERI	CLO	CFL	PEN
<b>Espécies</b>									
<i>A. caviae</i> (n = 30)	24 (80)	3 (10)	9 (30)	22(73,3)	-	30(100)	-	23 (76,6)	30 (100)
<i>A. sobria</i> (n = 4)	2(50)	-	1(25)	2 (50)	-	4 (100)	-	3 (75)	4 (100)
<i>A. salmonicida</i> (n = 6)	6 (100)	-	1(16,6)	1 (16,6)	-	6 (100)	-	1 (16,6)	6 (100)
<i>A. trota</i> (n= 1)	1 (100)	-	-	1(100)	-	1 (100)	-	1 (100)	1 (100)

ampicilina (AMP) ; tetraciclina (TET) ; ácido nalidíxico (NAL); vancomicina (VAN) ; ceftriaxona (CRO); eritromicina (ERI) ; cloranfenicol (CLO) ; cefalotina (CFL) ; penicilina ( PEN) .

Grande parte dos isolados obtidos foi resistente a eritromicina e todos os isolados foram resistentes à penicilina, 33 cepas foram resistentes a ampicilina, 28 a cefalotina, 26 a vancomicina, 11 ao ácido nalidíxico e três à tetraciclina. Nenhum dos isolados testados apresentou resistência ao cloranfenicol e a ceftriaxona (Figura 27).



**Figura 27:** Percentual de resistência a antimicrobianos das cepas de *Aeromonas* isoladas de água e sedimento em três pontos distintos do Rio Cocó, CE.

A elevada frequência de resistência a eritromicina está de acordo com estudos de Radu et al. (2003). Quanto à resistência à tetraciclina outros trabalhos (GHENGHESH et al., 2001; VIVEKANANDHAN et al., 2002) relatam frequências superiores às descritas para os isolados analisados. A eritromicina é um antibiótico que pertence à família dos macrolídios, sendo, portanto um bacteriostático eficiente que trabalha inibindo a síntese protéica dos microrganismos. É muito eficaz contra os cocos gram-positivos e é utilizado frequentemente como um substituto para a penicilina (TAVARES, 2001).

Os resultados obtidos nessa pesquisa concordam com os resultados encontrados por Goñi-Urriza et al. (2000). Esses autores relataram que a maioria das cepas de *Aeromonas* sp. recuperadas de amostras de águas coletadas em pontos próximos a descargas de esgotos em dois rios europeus (Arga, na

Espanha e Garonne, na França), eram resistentes a ampicilina (99%), cefalotina (93%) e cefatoxima (56%).

Vila et al. (2003) encontraram resistências de cepas de *Aeromonas* variáveis ao cloranfenicol e a tetraciclina, atribuindo esse fato ao uso extensivo desses agentes antimicrobianos em países industrializados. O cloranfenicol impede a união dos aminoácidos pela inibição da peptidiltransferase; já a tetraciclina atua inibindo a síntese protéica (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

As espécies de *Aeromonas* sp. testadas mostraram-se bastante sensíveis ao cloranfenicol e a ceftriaxona. Esses resultados concordam com os encontrados por Koehler e Ashdown (1993), que após testarem cerca de 22 antibióticos em espécies de *Aeromonas* isoladas de humanos (feridas, fezes e sangue) em Queensland, Austrália, detectaram a sensibilidade de todas a esses antibióticos.

Evangelista – Barreto (2006) estudando *Aeromonas* em ostras coletadas no Rio Cocó, encontrou todas as cepas sensíveis ao ciprofloxacina e ao cloranfenicol; e a maioria delas sensíveis ao ácido nalidixico, a ceftriaxona e a cefalotina, semelhantes aos dados encontrados nessa pesquisa.

No entanto, nossos resultados discordam dos encontrados por Miranda; e Castillo (1998) que, ao testarem resistência de *Aeromonas* móveis isoladas de amostras de água doce no Chile frente a antibióticos e metais pesados observaram que, mesmo em menor número, as cepas demonstraram resistência à tetraciclina.

No que diz respeito a vancomicina, antibiótico pertencente à família dos glicopeptídios, os resultados encontrados discordam dos apresentados por Martins (2005), que, ao analisar os efeitos da emissão dos efluentes domésticos na

proliferação de *Aeromonas* sp. em águas de superfície e pescado do estuário do rio Bacanga, São Luís/Ma, detectou cepas de *Aeromonas hydrophyla* e *Aeromonas caviae* sensíveis a esse antibiótico, enquanto que nesse trabalho mais da metade dos isolados de *A. caviae* se mostraram resistentes.

Chaudhury et al. (1996) relataram um aumento na incidência de cepas de *Aeromonas* sp. multi-resistentes isoladas tanto de fontes clínicas quanto ambientais, também observado nesse estudo, visto que das 41 cepas testadas 33 (80,5%) foram resistentes a pelo menos dois dos antibióticos utilizados, sendo todos de famílias diferentes (Tabela 8).

Das 33 cepas analisadas, apenas duas apresentaram resistência plasmidial a eritromicina, sendo assim essa resistência pode ser transmitida verticalmente de uma espécie de *Aeromonas* para outra, sugerindo que pode haver um aumento no grau de infecções por *Aeromonas* nos usuários dos rios.

Hirsch et al. (2006) estudando a resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* isoladas de peixes e ambientes aquáticos, puderam verificar que a resistência as quinolonas era cromossômica, concordando com os resultados desse trabalho, quando apenas 26% dos isolados apresentaram resistência plasmidial.

A presença de tais *Aeromonas* potencializa o risco de difusão de genes de resistência entre as populações bacterianas de ambientes aquáticos, quer seja sob forma de plasmídios, quanto por transposons (SCHMIDT et al., 2001).

Palu et al. (2006) analisando a resistência antimicrobiana de cepas de *Aeromonas* isoladas de alimento, encontraram resistência plasmidial a tetracilina, coincidindo com os resultados do presente trabalho. Somente uma cepa de *A.*

*salmonicida*, isolada do ponto B perdeu a resistência à tetraciclina após o processo da cura plasmidial. Das cinco cepas dessa mesma espécie quatro apresentaram resistência cromossomial à tetraciclina e a todos os outros antimicrobianos.

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 em clínicas (BROWN et al., 1997).

A presença desses elementos extracromossômicos nas cepas de *Aeromonas* sugere que, independente do local de coleta o rio Cocó pode representar não só uma fonte de organismos patogênicos, (como é o caso de *Aeromonas*), mas também uma fonte de organismos aptos a transferir fatores de resistência e capacidade adaptativas aos demais microrganismos presentes no ambiente.

**Tabela 8:** Perfil de multi-resistência antes e depois da cura, a antimicrobianos isolados de água e sedimento em três pontos distintos do Rio Cocó, CE.

Espécie	Perfil de resistência		
	Antes da cura	Depois da cura	
P O N T O  A	<i>A. caviae</i>	AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	VAN; CFL; PEN.
	<i>A. trota</i>	AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	VAN; CFL; PEN.
	<i>A. caviae</i>	AMP; NAL; VAN; ERI; CFL; PEN.	NAL; VAN; CFL; PEN.
	<i>A. caviae</i>	AMP; ERI; CFL; PEN.	CFL; PEN.
	<i>A. caviae</i>	AMP; ERI; CFL; PEN.	CFL; PEN.
	<i>A. caviae</i>	AMP; ERI; CFL; PEN.	CFL; PEN.
	<i>A. caviae</i>	AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	VAN; CFL; PEN.
	<i>A. caviae</i>	ERI; CFL; PEN.	CFL; PEN.
	<i>A. caviae</i>	AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	VAN; CFL; PEN.
	<i>A. salmonicida</i>	AMP; TET; VAN; ERI; CFL; PEN.	TET; CFL; PEN.
	<i>A. sobria</i>	AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	CFL; PEN.
	<i>A. salmonicida</i>	AMP; VAN; ERI; PEN.	VAN; PEN.
	<i>A. salmonicida</i>	AMP; TET; ERI; CFL; PEN.	TET.
	<i>A. caviae</i>	AMP; NAL; ERI; CFL; PEN.	-
	<i>A. caviae</i>	AMP; NAL; ERI; CFL; PEN.	-
	P O N T O  B	<i>A. caviae</i>	AMP; TET; NAL; VAN; ERI; CFL; PEN.
<i>A. caviae</i>		AMP; TET; NAL; VAN; ERI; CFL; PEN.	AMP; TET; NAL; VAN; CFL; PEN.
<i>A. salmonicida</i>		AMP; TET; NAL; VAN; ERI; CFL; PEN.	VAN; CFL; PEN.
<i>A. sobria</i>		AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	VAN; CFL; PEN.
<i>A. caviae</i>		ERI; CFL; PEN.	CFL; PEN.
<i>A. sobria</i>		AMP; NAL; ERI; CFL; PEN.	NAL; CFL; PEN.
<i>A. caviae</i>		AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	VAN; ERI; CFL; PEN.
<i>A. caviae</i>		AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	ERI; CFL; PEN.
<i>A. caviae</i>		AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	ERI; CFL; PEN.
<i>A. sobria</i>		AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	VAN; PEN.
<i>A. caviae</i>		AMP; VAN; ERI; PEN.	PEN.
<i>A. caviae</i>		AMP; TET; VAN; ERI; PEN.	VAN; PEN.
<i>A. caviae</i>		AMP; TET; VAN; ERI; CFL; PEN.	TET; CFL; PEN
<i>A. caviae</i>		AMP; NAL; VAN; ERI; CFL; PEN.	NAL; VAN; CFL; PEN.
<i>A. caviae</i>		AMP; VAN; ERI; CFL; PEN.	VAN; CFL; PEN.
<i>A. salmonicida</i>		AMP; TET; NAL; VAN; ERI; CFL; PEN.	TET
<i>A. salmonicida</i>	AMP; TET; VAN; ERI; PEN.	TET; VAN; PEN.	
<i>A. caviae</i>	AMP; ERI; PEN.	-	

## **6. CONCLUSÕES**

Conclui-se que o estuário do Rio Cocó está contaminado por *Aeromonas* e que muitas delas apresentam resistências a antibióticos denotando um ambiente poluído e de risco para a população que usa suas águas para lazer, pesca ou outra atividade qualquer.

## 7.0 - Referências Bibliográficas

ABBOTT S. L., CHEUNG W. K. W., JANDA J. M., The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, June 2003, p. 2348–2357

ADAMS, M. R., ; MOSS, M. O. Food Microbiology (second ed.). Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2000.

ALTWEGG M, GEISS HK. *Aeromonas* as an human pathogen. Crit Vet Microbio 16:253-86, 1999.

ALBERT, M.J. et al. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. Journal of Clinical Microbiology, v. 38, n. 10, p. 3785-3790, Oct., 2000.

AUSTIN, B.;ALTWEGG,M.;GOSLING,P.J.;JOSEPH,S. The genus *Aeromonas*. Journal Clinical Microbiology, v.24, p.228-232,1996.

AUTARQUIA MUNICIPAL DE FORTALEZA. Análise do diagnóstico ambiental da área de proteção ambiental do rio Cocó. Fortaleza: AUMEF, 1987.

AUSTIN, B., ; ADAMS, C. Fish Pathogens. In B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling, ; S. Joseph (Eds.), The Genus *Aeromonas* J. Wiley ; Sons, Ltd pp. 197–244, 1996.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal Clinical Pathology, v. 45, n. 4, p. 493 - 496, 1966.

BLACK, J. G.; Microbiology: principles and applications. 2. ed.. New Jersey: Prentice Hall, 1990.

BOTTARELLI, E. ; OSSIPRANDI, M.C. *Aeromonas* infections: an update. Artigo apresentado no Curso: “A nova cultura da produção animal no contexto da União Européia”, Universidade de Parma, Faculdade de Medicina Veterinária, Parma,1999.Disponível em:<<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/bottarelli2/bottarelli.htm>>,p.1-10. Acesso em: 20 out.2008.

BROWN,L.R., SANDERSON,K., KIROV, S.M.,Plasmids and *Aeromonas* virulence. FEMS Im Med. Microbiol. v. 17, 217-223, 1997.

BRANDI, G.; SISTI, M.; SCHIAVANO, G. F.; SALVAGGIO' L.; AND ALBANO. A. Survival of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. *Journal of Applied Bacteriology*, 81,439-444;1996.

BUCHANAN, R. L.; PALUMBO, S. A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *Journal of Food Safety*, v. 17, p. 15-29, 1985.

CAMERON,W.M. ; PRITCHARD,D.W. Estuaries. In:ILL,M.N. (ed).The sea ideas and observations on progress in the study of the seas. New York, Wiley. v.2, p.306-324, 1963.

CARDONHA, A. M. S., VIEIRA, R. H. S. F., PEIRANO, G., RODRIGUES, D. P.; Resistência a antibióticos e a metais pesados de *Escherichia coli* isoladas de água do mar e galerias pluviais. *Acta Cirúrgica Brasileira*. São Paulo, v. 20, nº. 1. p. 253 -256, 2005.

CARNAHAN, A. M., S. BEHRAM, AND S. W. JOSEPH. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 2843 – 2849,1991.

CARNAHAN, A .M., JOSEPH, S.W., Systematic assessment of geographically and clinically diverser aeromonads.*Systematic and Applied Microbiology*,Jena,v. 16, p. 72-84,2003.

CASAS, C., ANDERSON, E.C., OJO, K.K., KEITH, I., WHELAN, D., RAINNIE, D., ROBERTS, M.C. Characterization of pRAS1-like plasmids from atypical North American psychrophilic *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 59–63; 2005.

CASTRO-ESCARPULLI, G., FIGUERAS, M. J., AGUILERA-ARREOLA, G., SOLER, L., FERNANDEZ-RENDON, E., APARICIO, G. O. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 41–49;c2003.

CECON - Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda. Instruções de uso para discos de sensibilidade bacteriana para antibiograma completo. São Paulo, 4 p., 2003.

CHAMPSAUR, H., ANDREMONT, A., MATHIEU, D., ROTTMAN, E., AUZEPY, P., Cholera like illness due to *Aeromonas sobria*. *J. Infect. Dis.* 145, 248–254; 1982.

CHAUDHURY, A.;NATH, G.; SHUKLA, B.N.; SANYAL, S. C. Biochemical characterization enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. *Journal Medicine Microbiology*, v.44, p.434-437, 1996.

CHIQUITO, M.; MONTIANI F. F. Resistência bacteriana a antibióticos, in: Antibioticoterapia em pequenos animais. Ed. Ícone, São Paulo, 214 p; 1997.

CHOPRA, A.K; HOUSTON, C.W. Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. *Microbes and Infection*, v.1, p.1129-1137, 1999.

COLWELL, R. R., M. T. MACDONELL, AND J. DE LEY. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:473–477;1986..

CORREDORIA, J.M., ARIZA,J., PALLARES,R. Gram-negative bacillary cellulitis in patients with hepatic cirrhosis. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*, v.13, p.19-25,1994.

DA SILVA, E. V. Modelo de aproveitamento de los manglares de marisco y Barro Preto – Aquiraz – Ceará – Brasil. 347p. (Dissertação de Mestrado). Zaragoza; 1987.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control* v.17,p.474–483, 2006.

DOWNES, F.P.; ITO, K; Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4<sup>th</sup> ed, Washington, DC: ASM, ED. 2001.

ESPOSTO, E.M; SILVA, W. C. P; REIS, C. M. F; REIS, E. M. F; R., R. V; R., DÁLIA P; L., N S. Enteropatógenos bacterianos em peixes criados em uma estação de reciclagem de nutrientes e no ecossistema relacionado / Bacterial enteropathogens from fishes of a nutrient recycle system and its ecosystem *Pesqui. vet. bras Braz. j. vet. res*;27(4):144-148, abr. 2007.

ESTEVES, A.T. Patologia en Acuicultura. Espanha: Caicyt. Enfermidades bacterianas: 550p. 1988.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S; Vieira, Regine H.S.F; Carvalho, Fátima Cristiane T; Torres, Regina C.O; SANTANNA, E. ; Rodrigues, Dália P. ; Reis, Cristhiane M.F. . *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo*, v. 48, p. 129-133, 2006.

FIGUEIREDO, H.C.P. CASTRO, G.A.C., LEAL, C.A.G., LOPES, C.O., Quem tem medo de *Aeromonas*? *Panorama da Aqüicultura*, p. 26-31, julho/agosto 2008.

FIORENTINI, C., BARBIERI, E., FALZANO, L., MATARRESE, P., BAFFONE, W., PIANETTI, A., KATOULI, M., KUHN, I., MOLLBY, R., BRUSCOLINI, F., CASIERE, A., DONELLI, G., Occurrence, diversity and pathogenicity of mesophilic *Aeromonas* in estuarine waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. *J. Appl. Microbiol.* 85, 501–511, 1998.

FORTALEZA – GUIA DIGITAL. Ceara: Aerofoto Nordeste Ltda, [2001]. 1 CD-ROM. Windows 98.

FOSSE, T., GIRAUD-MORIN, C., MADINIER, I., Phenotypes of betalactam resistance in the genus *Aeromonas*. *Pathol. Biol.* 51, 290–296, 2003.

FREITAS, A.C., SOUZA, S.M.S., MACEDO, L.C., PINTO, E.C., PEREIRA, S.S., *Aeromonas* species associated with gastroenteritis in children: prevalence, characteristics and virulence properties. *Rev. Microbiol.* 29, 152–157, 1998.

GALBIS, D.M., FARFÁN, M., LORÉN, J.G., FUSTÉ, M.C. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* sp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 420-430, 2002.

GAUTAM, A .R., PATHAK, S., P., RAMITEKE, P.W. Virulence factors in environmental isolates of *Aeromonas* sp. *Journal General Applied Microbiology*, v.38, p.185-191, 1992.

GHENGHESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; TAHRUNI, A.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 169-173, Feb. 2001.

GOBAT, P., ; JEMMI, T. Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw and ready-to-eat fish and meat products in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 20, 117–120; 1993.

GOÑI-URRIZA, M., M. CAPDEPUY, C. ARPIN, N. RAYMOND, P. CAUMETTE, AND C. QUENTIN; Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 125–132; 2000.

GROHMANN, E.; MUTH, G.; ESPINOSA, M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 2, p. 277-301, June, 2003.

HAVELAAR, A. H.; SCHETS, F. M.; VAN SILFHOUT, A.; JANSEN, W. H.; WIETEN, G.; VAN KOOIJ, D. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *Journal Applied Microbiology*, v. 72, p. 435-444, 1992.

HIRSCH, D. JÚNIOR, D J P., LOGATO, P V R. .PICCOLI, R H., FIGUEIREDO, H C P. Identificação e Resistência a Antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, nov./dez., 2006.

HUGUET, J.M., RIBAS, F. SGAP-10C agar for the isolation and quantification of *Aeromonas* from water. *Journal Applied Bacteriology*, v.70, p. 81-88, 1991.

HUSS, H.H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. *Food Control*, v. 8, n. 91-98, 1997.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microbiologia de los Alimentos: Características de los Patógenos Microbianos*. 4a Ed. Zaragoza, España: Acribia, 1998.

INSTITUTO DO PLANEJAMENTO DO CEARÁ. Atlas do estado do Ceará. Fortaleza: IPLANCE, 1995.

ISONHOOD, J.H., GERARD,P., LEENANON,B.,DRAKE,M. Stress response of *Aeromonas hydrophila* following environmental challenges. *Food Microbiology*, v.19, p. 285-293, 2002.

JANDA, J.M., Recent Advances in the Study of the Taxonomy, Pathogenicity, and Infectious Syndromes Associated with the Genus *Aeromonas*. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, Oct. 1991, p. 397-410.

JANDA JM, ABBOTT SL, Morris JG Jr. *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella*. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerant RL, eds. *Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1995:905–17.

JANDA, J.M., ABBOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* 27, 332–344; 1998.

JOSEPH, S. W. AND A. CARNAHAN, A. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annual Review of Fish Diseases*. 4: 315 – 343,1994.

JOSEPH, S. W., CARNAHAN, A. M. Update on the genus *Aeromonas*. *ASM News*, 66, 218–223, 2000.

JÚNIOR, D. J. P., FIGUEIREDO H.C.P., CARNEIRO, D.O., LEAL, C. A.G. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1190-1195, nov./dez., 2006

KIROV, S. M. *Aeromonas* and *Plesiomonas* Species. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (second ed., pp. 301–328; 2001.

KIROV, S. M. *Aeromonas* Species. In A. D. Hocking (Ed.), Foodborne microorganisms of public health significance (sixth ed., pp. 553–575). AIFST Inc. (NSW Branch); 2003.

KOEHLER JM, ASHDOWN LR. In vitro susceptibilities of tropical strains of *Aeromonas* species from Queensland, Australia, to 22 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*; 37:905–7; 1993.

LALLIER, R., D. LEBLANC, K. R. MITTAL, AND G. OLIVIER. Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 42: 56 – 60, 1981.

LEITÃO, M.F.F; SILVEIRA, N.F.A. *Aeromonas* sp. e *Plesiomonas shigelloides* na água, pescado e hortaliças, no Estado de São Paulo. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)*, v.21, nº 1, p.90-99, jan. /jun., 1991.

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 seawater. *Water Research*, v.37, p. 2865-2874, 2003.

MACDONELL MT, COLWELL RR. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst Appl Microbiol*, 6:171–82; 1985.

MARCEL, K.A.;ANTOINETTE, A.A.;MIREILLE,D. Isolation and characterization of *Aeromonas* species from an eutrophic tropical estuary. *Marine Pollution Bulletin*, v.44, p. 1341-1344, 2002.

MARTINS, L.M., MARQUEZ, R.F., YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.32, p. 237- 242, 2002.

MARTINS, A. G. L. A. EFEITOS DA EMISSÃO DOS EFLUENTES DOMÉSTICOS NA PROLIFERAÇÃO DE *Aeromonas* sp. EM ÁGUAS DE SUPERFÍCIE E PESCADO DO ESTUÁRIO DO RIO BACANGA, SÃO LUÍS – MA. 2005.(Dissertação de Mestrado).

MATTÉ, M.H. 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).

MATTÈ, M. H.; MATTÉ, G. R.; BALDASI, L.; NITRINI, S. M. O. O. Ocorrência de *Aeromonas* spp, em água de represa destinada à recreação e captação para abastecimento público. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, Santos, Sociedade Brasileira de Microbiologia, Anais Santos, 1995, p. 49. 1995.

MEIRELES, J. professor do departamento de Geografia da Universidade Federal do Ceará, Disponível em [www.terramar.org.br/oktiva.net/1320/nota/25791/](http://www.terramar.org.br/oktiva.net/1320/nota/25791/) , Acessado em : 27 maio 2008.

MELO, M.T.D., SAKER-SAMPAIO, S., VI EIRA, R.S.H.F. Avaliação da poluição orgânica no estuário do Rio Ceará (Fortaleza - Ceará - Brasil). *Caatinga*, 7: 207 - 219, 1990.

MERINO, S. RUBIRES, X., KNOCHER, S., TOMÁS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas* sp. *International Journal of Food Microbiology*, v.28, p.157-168, 1995.

MIRANDA, C.D; CASTILLO,G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from chilean freshwater. *The Science of the Total Environment*, v.224, p.167- 176, 1998.

MOLINA-AJA A., GARCÍA-GASCA A., ABREU-GROBOIS A., BOLÁN-MEJÍA C., ROQUE A., GOMEZ-GIL B. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. *FEMS Microbiology Letters*. 213, 7-12; 2002.

MORAES D.S.L; JORDÃO B.Q.O. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Revista Saúde Pública*, v.36, nº 3, 2002.

MORIARTY, D. J. W. Disease Control in Shrimp Aquiculture with Probiotic Bacteria. *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Halifax, Canada, 1999.

MOROZZI, G., G. CENCI, F. SCARDAZZA, AND M. PIZURRA. Cadmium uptake by growing cells of gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbios* 48:27–35; 1996.

MOURINO, J. L. P.; MARTINS, M. L.; M.YAMASHITA, M.; BATISTA, C. R. V.; PEREIRA, M. A. Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em girinos de rã-touro na metamorfose *Pesquisa Agropecuária Brasileira* Pesq. agropec. bras. Vol.41 no. 8 Brasília Aug. 2006.

NOJIMOTO, I. T. I.; BEZANA, C. S. C.; CARMO, C.; VALADÃO, L. M.; CARRIJO, K. D. M. Prevalência De *Aeromonas Spp* Em Fezes Diarréicas De Crianças Menores De 5 Anos De Idade Na Cidade De Goiânia, Goiás, No Biênio. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* 30(5): 385-388, set-out, 1997.

PALU, A. P.;GOMES L. M.; MIGUEL M.A.L.; BALASSIANO, I.T.; QUEIROZ M.L.P.; FREITAS-ALMEIDA, A.C.; OLIVEIRA, S.S., Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiology*, v.23,p. 504–509; 2006.

PASQUALE, V., BALODA, S.B., DUMONTET, S. et al. An outbreak of *Aeromonas hydrophila* infection in turtles (*Pseudemys scripta*). *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, p.1678-680, 1994.

PEREIRA, C. S.; RODRIGUES, D. P.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; *Aeromonas* spp. E *Plesiomonas shigelloides* Isoladas A Partir De Mexilhões (*Perna Perna*) In *Natura E Pré-Cozidos No Rio De Janeiro*, RJ, Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 24(4): 562-566, out.-dez. 2004

PESSOA, E.V. ESTUDO DO “STANDING-CROP” DA ÁGUA DO ESTUÁRIO DO RIO COCÓ (CEARÁ-BRASIL), COMO INDICADOR DAS MODIFICAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DO MEIO. 142p. (Dissertação de Mestrado). 2002.

PLUMB, J.A. Health maintenance of cultured fishes. Principal microbial diseases. USA: CRC, 1994. 254p.

POPOFF, M. and M. Vernon. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila* *Aeromonas punctata* group. *Journal of General Microbiology*. 94: 11 – 22, 1976.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 81, p. 261-266, 2003.

REINA, J.; ILOMPART, I.; GÓMEZ, J.; BORRELL, N.; SERRA, A. *Aeromonas caviae*: principal especie enteropatógena del grupo de lãs *Aeromonas* mesófilas durante el período de lactancia artificial en la población de Palma de Mallorca (Balaes). *Revista Espanhola de Pediatria*, v. 47, n. 2, p. 146-150, 1991.

REINA, J.; LOPEZ, A. Gastroenteritis caused by *Aeromonas trota* in a child. *Journal of Clinical Pathology*, v. 49, p. 173-175, 1996.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MCGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. W. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A. *Applied and Environmental Microbiology*, Amsterdam, v. 66, n. 9, p. 3883-3890, Sept. 2000.

ROCCO C. CIPRIANO; *Aeromonas Hydrophila* And Motile Aeromonad Septicemias Of Fish. United States Department Of The Interior Fish And Wildlife Service Division Of Fishery Research Washington, D. C. 20240, 2001.

ROCHA, S. M. Estudo da Ocorrência do Gênero *Aeromonas* em sistema de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no município de Lins – SP. 2004.(Tese de Doutorado).

RODRIGUES, D.P., RIBEIRO, R.V., Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado: teoria e prática/ coordenadora Regine Helena dos Fernandes Vieira. São Paulo: Livraria Varela, p. 151-174, 2004.

ROSSI JÚNIOR, O. D.; SANTOS, I. F.; AMARAL, L. A.; BARBOSA, A. M. Bacteria of the genus *Aeromonas* in water and beef obtained at the industrial level. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 3, n. 3, p. 75-78, 1996.

RUIMY, R., V. BREITTMAYER, P. ELBAZE, B. LAFAY, O. BOUSSEMART, M. GAUTHIER, AND R. CHRISTEN. 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small subunit rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:416–426.

SANTOS, R. C. V., HOERLLE, J. L., AQUINO, A. R. C., MORESCO, R.M.; Prevalência de *Escherichia coli*, *Kebsiella pneumoniae* e *Kebsiella oxytoca* produtoras de  $\beta$  – Lactamases de espectro estendido (ESBL) em pacientes do Hospital Divina Providencia, Porto Alegre, RS. Revista Brasileira de Análises Clínicas. Porto Alegre, v. 35. p. 55 -57, 2003.

SAUTOUR, M.; MARY, P.; CHIHIB, N. E.; HORNEZ, J. P. The effects of temperature, water activity and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila* and on its subsequent survival in microcosm water. Journal of Applied Microbiology, v.95, 807-813, 2003.

SCHMIDT, A. S., BRUUN, M. S., DALSGAARD, I., ; LARSEN, J. L. Incidence, distribution and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile *Aeromonads* from a fish farming environment. Applied and Environmental Microbiology, 67(12), 5675–5682; 2001.

SCHUBERT, R. H. W. The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas* Kluver and van Niel 1936. Part I. Suggestions on the taxonomy and nomenclature of the aerogenic, 1967.

SEIDLER, R. J.; ALLEN, D. A.; LOCKMAN, H.; COLWELL, R. R.; JOSEPH, S. W.; DAILY, O. P. Isolation, enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. Applied and Environmental Microbiology, v. 39, n. 5, p. 1010-1018, 1980.

SINELL, H.J. Introduccion a la higiene de los alimentos. Zaragoza, Acribia., 167p, 1981.

SNIESZKO, S. F. Genus IV. *Aeromonas* Kluver and van Niel 1936. Pages 189-193 in R. S. Breed, E. G. D. Murray, and N. R. Smith, eds. Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland, 1957.

SOBECKY, P. A. Plasmid ecology of marine sediment microbial communities. *Hydrobiologia*, v. 401, p. 9-18, 1999. THORNLEY, J.P. et al. Virulence properties of clinically significant *Aeromonas* species: Evidence for pathogenicity. *Reviews in Medical Microbiology*, Londres, v. 8, n. 2, p. 61-72, Apr. 1997.

TAVARES, W.; Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antifecciosos. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p. 816, 2001.

TORRES, D.P.C. Aspectos do tratamento biológico de esgotos domésticos. *Revista Científica de IMAPES*, abr., p.68-70, 2004.

TRABULSI, R. L., ALTERTHUM, F.; *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 718 p.

TURNBULL, P. C. B.; LEE, J. V.; MILIOTIS, M. D.; VAN DE WALLE, S.; KOORNHOF, H. J.; JEFFERY, L. J.; BRYANT, T. N. Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 19, p. 175-180, 1984

UMOLU, P.I.; OMIGIE, O.; TAFTFENG, Y.; OMOROGBE, F. I.; AISABOKHALE, F.; UGBOAGAH, O. P. Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Escherichia coli* isolates obtained from different human clinical specimens in Lagos – Nigeria. *Journal of American Science*, v. 2, n. 4, p. 70-76, 2006.

VASCONCELOS, F.P.; FREIRE, G.S.S. Estudo preliminar dos aspectos hidrodinâmicos e sedimentológicos do estuário do Cocó, Estado do Ceará. *Arquivo Ciências do Mar*. Fortaleza: UFC, 1987.

VÉRON, M. La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bactéries comparables. *C. R. Acad. Sci. Paris* 261:5243–5246, 1965.

VILA, J.; MARCO, F.; SOLER, L.; CHACON, FIGUERAS, M.J. *In vitro* antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype sobria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, p. 697-702, 2003.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 76, p. 165- 168, 2002.

VON SPERLING. Água para saciar corpo e espírito: balneabilidade e outros usos nobres. *In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 22. Joinville: [s.n.], 2003.

WALKER, S. J.; BROOKS, J. Survey of the incidence of *Aeromonas* and *Yersinia* species in retail foods. *Food Control*, v. 4, n. 1, p. 34-40, 1993.

WOHLEGEMUTH, D., PIERCE, R.L., KIRKBRIDE, C.A. A bovine abortion association with *Aeromonas hydrophila*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.160, p.1001-1002, 1972.

ZHANG, Y. L., C. TONG, AND K. Y. LEUNG. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology*. 146: 999 – 1009; 2000.