

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA  
DOUTORADO EM ENGENHARIA DE PESCA

FRANCISCA GLEIRE RODRIGUES DE MENEZES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO  
*VIBRIO* ISOLADAS EM ALGUNS ESTUÁRIOS DO ESTADO DO CEARÁ

FORTALEZA  
2011

FRANCISCA GLEIRE RODRIGUES DE MENEZES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO  
*VIBRIO* ISOLADAS EM ALGUNS ESTUÁRIOS DO ESTADO DO CEARÁ

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenheiro de Pesca.

Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

Co-orientadora: Dra. Grace Nazareth Diogo Theophilo

FORTALEZA

2011

M522c Menezes, Francisca Gleire Rodrigues de  
Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias do  
gênero *Vibrio* isoladas em alguns estuários do Estado do Ceará /  
Francisca Gleire Rodrigues de Menezes, 2011.  
93 f. ; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes  
Vieira

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia  
de Pesca

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em  
Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2011.

1. Recursos Pesqueiros. 2. Engenharia de Pesca. 3. Microbiologia  
ambiental. I. Vieira, Regine Helena Silva dos Fernandes (orient.) II.  
Universidade Federal do Ceará – Instituto de Ciências do Mar, Pós-  
Graduação em Ciências Marinhas Tropicais. III. Título

CDD 639.543

FRANCISCA GLEIRE RODRIGUES DE MENEZES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO  
*VIBRIO* ISOLADAS EM ALGUNS ESTUÁRIOS DO ESTADO DO CEARÁ

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenheiro de Pesca. Área de Concentração Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 30 / 03 / 2011

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Ernesto Hofer  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

---

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa  
Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR - UFC

---

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni  
Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR - UFC

---

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Aos meus pais, Joaquim e Liduína, minha avó Maria (*in memoriam*) e ao meu amado Pedro Ernesto. Sem o apoio de vocês nunca teria conseguido chegar até esse momento.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Joaquim e Liduína, sem vocês essa vitória seria impossível.

Aos meus irmãos Suyane e Alexandre, e a minha Tia Francisca por todo o incentivo no decorrer da caminhada.

Ao meu marido, Pedro Ernesto, por todo amor, apoio e dedicação.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, e especialmente a Oscarina Viana, Norma Barreto, Cleidenora de Paula, Cristiane Teles, André Carvalho, Karla Catter, Renata Costa, Ricardinho Albuquerque, Edirsana Cecatto, Soraya Neves, Anahy Lima, Carol Martins, Janaína Andrade e Janisi Aragão pela amizade de todas as horas.

Aos meus companheiros do doutorado: Marcelo Carneiro, Reinaldo Marinho, Carlos Augusto, Rodrigo Salles, Israel Cintra, Aureliana, Carlos Riedel, Márcia Barbosa e Janisi Aragão. Obrigada por todas as horas de descontração.

A todos meus companheiros de laboratório: Rayza Araújo, Ana Maria Almeida, Lana Leite, Camilla Brandão, Alberto Gomes, Fábio Vasconcelos, Jackson Peixoto, Giselle Silva, Rafael Rocha, Isabel Kalene e Camila Magalhães.

À Morgana Oliveira, Camilla Brandão e Soraya Neves, por toda ajuda em campo e no laboratório. Esse trabalho é nosso!

Ao Prof. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira, por todo incentivo ao longo do curso. Um pesquisador admirável.

Ao Prof. Rodrigo Maggioni, por estar sempre disposto a me ensinar os desafios da Biologia Molecular.

Aos integrantes do laboratório de Biologia Molecular: em especial, a Cândida Vila-Nova e João Mafaldo, por toda ajuda ao longo da pesquisa.

À secretária do doutorado Rogéria Setubal.

À Funcap pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

Ao Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, nas pessoas do senhor Edilson, Célia, Hanne, Dona Zuíla, Francisco, Wagner e Senhor Chico.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa

**Muito Obrigada!!!!!!**

### **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A minha orientadora Profa. Dra. Regine Vieira por todo o incentivo ao longo dos anos. Com quem aprendi que ciência é uma arte que devemos amar se quisermos progredir e que nunca devemos desistir dos nossos sonhos. Obrigada por tudo cheirosa!

Ao Dr. Ernesto Hofer que sempre foi um braço forte me encorajando e salvando em todos os momentos difíceis na minha caminhada científica. Com quem aprendi que sempre devemos ter tempo para passar nosso conhecimento para quem está disposto a aprender. Muito obrigada!

A Dra. Grace Theophilo por toda sua dedicação a mim e a pesquisa, sempre indicando qual o caminho certo a seguir. Sua determinação é uma fonte de inspiração constante. Obrigada!

## RESUMO

Muitas pesquisas têm associado contaminação aquática ambiental com infecções de *Vibrio* em humanos, sugerindo que a importância do monitoramento sistemático das cepas ambientais se faz necessário para definir seu possível potencial patogênico e sua significância clínica. O objetivo dessa pesquisa foi estudar a diversidade do gênero *Vibrio* isolado de quatro regiões estuarinas no Estado do Ceará, (Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe). As coletas realizadas resultaram num total de 32 amostras de água e 32 de sedimento, durante os meses de janeiro a abril de 2009. Foram catalogadas 19 espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*, das quais *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio alginolyticus* foram as mais abundantes nos quatro estuários: *V. parahaemolyticus* no Rio Choró e *V. alginolyticus* no Rio Pacoti. As cepas identificadas foram submetidas a testes de susceptibilidade a quinze antimicrobianos. Todas as cepas analisadas (197) apresentaram susceptibilidade a sulfazotrim, ciprofloxacina, ácido nalidíxico e cloranfenicol, sendo que cento e sessenta e três (82%) apresentaram resistência a penicilina G, cento e oito (54%) a ampicilina, quinze (7%) a cefalotina, três (1%) a aztreonam, uma (0,5%) a gentamicina, a cefotaxima e a ceftriaxona. Cinquenta e uma cepas (25%) apresentaram comportamento intermediário frente à cefalotina, vinte e oito cepas (14%) a ampicilina, dez (5%) a aztreonam, oito (4%) a tetraciclina, duas (1%) a oxitetraciclina e uma (0,5%) a florfenicol, a cefotaxima, a ceftriaxona, a estreptomina e a gentamicina. Foram escolhidas cinco espécies patogênicas ao homem para verificação de seus fatores de patogenicidade. As cepas identificadas como *V. parahaemolyticus* (64) e *V. cholerae* (9) foram analisadas através de técnicas de biologia molecular, usando genes que confirmam as espécies e genes que indicam virulência. Das 64 amostras de *V. parahaemolyticus* analisadas, 63 foram positivas para o gene *tl*, específico para espécie, 57 para o gene *tdh* e 20 para o *trh*, genes que indicam patogenicidade. Das nove cepas de *V. cholerae*, cinco foram positivas para o gene *ompW*, gene específico para espécie, porém, nenhuma amostra apresentou os genes de virulência *ctxA*, *zot*, *tcp* e *rfbO1*. Com isso conclui-se que os estuários dos rios analisados apresentam uma elevada abundância de espécies, tendo *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* como as mais abundantes. O antibiograma das cepas isoladas mostrou uma elevada resistência à penicilina e a ampicilina. Foram encontradas elevada positividade para a presença dos fatores de virulência nas cepas pertencentes às espécies de *Vibrio* patogênicas a humanos. As cepas de *V. parahaemolyticus* apresentaram genes de virulência indicando que as cepas podem acarretar danos à saúde pública. A presença do *V. cholerae* foi confirmada nas águas e sedimento dos estuários.

Palavras-chave: diversidade, *Vibrio cholerae*, genes de virulência

### ***Abstract***

The frequent association of environmental aquatic contamination with vibriosis in humans suggests the need for systematic monitoring and study of environmental vibrio strains and their pathogenic potential and clinical significance. The objective of this study was to evaluate the diversity of vibrio species in four estuaries (Pacoti, Choró, Pirangi and Jaguaribe) in Ceará, Northeastern Brazil. Nineteen vibrio species were identified in 32 water samples and 32 sediment samples collected between January and April 2009. Overall, *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* were the most abundant (the former in Choró, the latter in Pacoti). The isolated strains were submitted to antibiogram testing with 15 antibiotics. All strains (n=197) were susceptible to sulfamethoxazol-trimetoprim, ciprofloxacin, nalidixic acid and chloramphenicol. Resistance was observed to penicillin G (n=163; 82%), ampicillin (n=108; 54%), cephalothin (n=15; 7%), aztreonam (n=3; 1%), gentamicin, cefotaxime, ceftriaxone (1 each; 0.5%). Partial resistance was observed to cefalotin (n=52; 25%), ampicillin (n=28; 14%), aztreonam (n=10; 5%), tetracycline (n=8; 4%), oxytetracycline (n=2; 1%), and florfenicol, cefotaxime, ceftriaxone, streptomycin and gentamicin (1 each; 0.5%). Five species known to be pathogenic to humans were chosen for analysis of factors of pathogenicity. Strains belonging to the species *V. parahaemolyticus* (n=64) and *V. cholerae* (n=9) were submitted to molecular analysis using genes to confirm the species and indicate virulence. Sixty-three strains of *V. parahaemolyticus* were positive for species-specific *tl*, 57 were positive for *tdh* and 20 for *trh*. Five strains of *V. cholerae* were positive for species-specific *ompW*, but no strains presented the genes *ctxA*, *zot*, *tcp* or *rfbO1*. In conclusion, the estuaries surveyed presented a great diversity of vibrio species, the most abundant of which were *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. Resistance to penicillin and ampicillin was elevated and positivity for virulence factors was considerable among strains of species pathogenic to humans. *V. parahaemolyticus* strains presented virulence genes indicating risk to public health. *V. cholerae* was identified in samples of both water and sediment.

**Key words:** diversity, *Vibrio cholerae*, virulence genes

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

- Figura 1** Mapa das localidades dos quatro estuários, Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará), de onde procederam as amostras de água e sedimento. 29
- Figura 2** Fluxograma da colimetria das amostras de água coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará). 33
- Figura 3** Fluxograma da colimetria das amostras de sedimento coletados nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará). 34
- Figura 4** Fluxograma da quantificação e identificação de víbrios isolados das amostras de água coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará). 35
- Figura 5** Fluxograma para quantificação e identificação de víbrios isolados das amostras de sedimento coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará). 36
- Figura 6** Fluxograma da técnica do antibiograma realizada com os isolados das amostras de água e sedimento coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará). 42
- Figura 7** Fluxograma da técnica da cura de plasmídeo realizada com os isolados das amostras de água e sedimento coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará). 43
- Figura 8** Número de cepas das espécies de *Vibrio* isoladas de água e sedimento coletadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará) 54
- Figura 9** Número de cepas de *Vibrio cholerae* não O1 e não O139 detectadas nas quatro coletas realizadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará). 59
- Figura 10** Número de cepas das espécies de *Vibrio* detectadas nas amostras de água e sedimento coletadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará). 60
- Figura 11** Percentual de sensibilidade a diferentes antimicrobianos de 197 cepas de *Vibrio* spp. isoladas de água e sedimento coletados nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará). 62
- Figura 12** Perfil eletroforético da Polymerase Chain Reaction (PCR) de nove cepas classificadas genotipicamente como *Vibrio cholerae* com os primers detectores do gene *OmpW* (304 pb) utilizado para detectar espécie. As cepas P1 e P2 são, respectivamente, padrão O1 Clássico 569B e não O1 IOC 15.177. 72

**Figura 13** Perfil eletroforético do PCR das cepas identificadas como *Vibrio cholerae* (Vc) com os primers dos genes de virulência: *ctxAB* (536 pb), *tcp* (805 pb), *rfbO1* (638 pb), e *zot* (947 pb). As cepas P1 e P2 são, respectivamente, O1 Clássico 569B e não O1 IOC 15.177. 73

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b>	Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras de <i>V. parahaemolyticus</i> .	45
<b>Tabela 2:</b>	Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para as estirpes de <i>V. parahaemolyticus</i> .	46
<b>Tabela 3:</b>	Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras de <i>V. cholerae</i> .	47
<b>Tabela 4:</b>	Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para as estirpes de <i>V. cholerae</i> .	48
<b>Tabela 5:</b>	Estimativa do número mais provável (NMP) de Coliformes Totais (Ct) e Coliformes Termotolerantes (Ctt) nas amostras de água e sedimento coletadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangí e Jaguaribe.	50
<b>Tabela 6:</b>	Valores médios das variáveis ambientais (temperatura, pH e salinidade) obtidas das amostras de água dos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).	52
<b>Tabela 7:</b>	Número de cepas das espécies de <i>Vibrio</i> detectadas nas amostras de água e sedimento coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangí e Jaguaribe (Ceará).	55
<b>Tabela 8:</b>	Perfil dos fatores de virulência apresentados pelas espécies potencialmente patogênicas ao homem de <i>Vibrio</i> spp. isoladas de água e sedimento dos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).	65
<b>Tabela 9:</b>	Percentual de positividade na caracterização enzimática dos isolados de <i>Vibrio</i> spp. potencialmente patogênicos a humanos.	66
<b>Tabela 10:</b>	Resultado do teste hemolítico do fenômeno de Kanagawa, reação de urease, gene de identificação da espécie do <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e seus genes de virulência <i>tdh</i> e <i>trh</i> para as amostras de água e sedimento dos quatro estuários analisados, no Estado do Ceará.	69
<b>Tabela 11:</b>	Número dos isolados de <i>V. parahaemolyticus</i> por tipo de amostra com a presença dos genes de identificação de espécie, da toxina e do fenômeno de Kanagawa.	70

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	18
2.1	Geral	18
2.2	Específicos	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	19
3.1	Estuário e Manguezal	19
3.2	Antimicrobianos	20
3.3	<i>Vibrio</i>	22
3.4	Patogenicidade e fatores de virulência	23
3.4.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	24
3.4.2	<i>Vibrio cholerae</i>	25
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	29
4.1	Local de Coleta	29
4.2	Coleta das Amostras	30
4.3	Determinação dos fatores extrínsecos	30
4.4	Preparo das Amostras	30
4.4.1	Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais (Ct) e Coliformes Termotolerantes (CT)	30
4.4.2	Teste presuntivo	31
4.4.3	Teste confirmatório	31
4.5	Isolamento de <i>Vibrio</i> spp.	31
4.5.1	Amostras de água	31
4.5.2	Amostras de sedimento	32
4.5.3	Semeadura inicial das amostras	32
<b>4.6</b>	<b>Identificação das cepas suspeitas de <i>Vibrio</i> spp.</b>	37
4.6.1	Identificação presuntiva	37
4.6.1.1	Coloração de Gram	37
4.6.1.2	Prova da produção de citocromo-oxidase	37
4.6.1.3	Motilidade	38
<b>4.7</b>	<b>Identificação definitiva</b>	38
4.7.1	Prova da Hidrólise da Arginina e Descarboxilação da Lisina e Ornitina	38

4.7.2	Prova de halofilismo:	39
4.7.3	Teste de Voges-Proskauer (VP)	39
4.7.4	Teste da hidrólise do Orto-nitrofenil- $\beta$ – D-Galacto-Piranosídeo (ONPG)	39
4.7.5	Prova da fermentação de carboidratos	40
4.7.6	Teste de produção do Indol	40
4.7.7	Teste de Kanagawa	40
<b>4.8</b>	<b>Teste de sensibilidade aos antimicrobianos</b>	<b>41</b>
<b>4.9</b>	<b>Técnica da cura de plasmídeo</b>	<b>42</b>
<b>4.10</b>	<b>Testes fenotípicos de identificação de fatores potenciais de virulência</b>	<b>43</b>
4.10.1	Propriedades enzimáticas e hemolíticas das culturas bacterianas	44
<b>4.11</b>	<b>Identificação genotípica dos isolados</b>	<b>44</b>
4.11.1	Extração do DNA cromossômico das amostras suspeitas de serem <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. cholerae</i>	44
4.11.2	Genes utilizados para as estirpes de <i>V. parahaemolyticus</i>	45
4.11.3	Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para as estirpes de <i>V. parahaemolyticus</i> .	45
4.11.4	Genes utilizados para as estirpes de <i>V. cholerae</i>	46
4.11.5	Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para estirpes de <i>V. cholerae</i> .	47
4.11.6	Visualização do produto da extração e dos amplicons	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
5.1	Efeito da contagem de Coliformes Totais (Ct) e Coliformes Termotolerantes (CT) na abundância dos vîbrios nos quatro estuários estudados	49
5.2	Efeitos dos parâmetros ambientais na abundância dos vîbrios nos quatro estuários estudados	51
5.3	Detecção das estirpes de <i>Vibrio</i> spp. em água e sedimento nos quatro estuários estudados	53
5.4	Susceptibilidade das cepas de <i>Vibrio</i> aos antimicrobianos	61
5.5	Detecção de fatores de virulência e propriedades enzimáticas e hemolíticas das culturas bacterianas patogênicas humanas.	64
5.6	Identificação genotípica dos isolados	67
5.6.1	Detecção de <i>V. parahaemolyticus</i> em água e sedimento por PCR e multiplex PCR	67

5.6.2	Detecção de <i>V. cholerae</i> em água e sedimento por PCR e multiplex PCR	71
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em virtude do acelerado crescimento urbano-industrial das cidades, o aporte de cargas poluentes carregadas para os ecossistemas aquáticos costeiros tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (IGBNOSA; OKOH, 2008). Tal descarga compromete a qualidade ambiental, fazendo com que seja necessária a utilização de indicadores para ajudar na avaliação das alterações existentes (MARINS; PAULA FILHO; ROCHA, 2007). Vale ressaltar que a sensibilidade dos ecossistemas naturais aos impactos depende das características ecológicas, biogeoquímicas, e das atividades humanas existentes. O que se sabe é que, os ecossistemas naturais possuem uma capacidade intrínseca de imobilizar substâncias contaminantes (LACERDA, 2007).

Dentre os ambientes costeiros, o ecossistema manguezal é bastante estudado por apresentar várias funções e serviços, sendo responsável pela ciclagem dos nutrientes (CANNICCI *et al.*, 2009), produtividade elevada, proteção dos ambientes costeiros contra a erosão e enxurradas (FIELD, 1995), e manutenção de várias espécies de plantas e animais (MARINS; PAULA FILHO; ROCHA, 2007). Várias atividades são realizadas no manguezal dentre elas pode-se citar a retirada da madeira para construção de botes ou de lenha e a construção de tanques para a aquicultura, uma atividade econômica que tem crescido a nível mundial (LI; CHEN, 2009, NAYLOR *et al.*, 1998). Com a aquicultura o uso de antimicrobianos como agentes terapêuticos também aumentou, sendo muitas vezes encontrados no ambiente (MUDRYK, 2005).

Os antimicrobianos são drogas utilizadas na medicina humana e veterinária visando prevenção e o tratamento de doenças (KIM *et al.*, 2007). Após o início da sua utilização, algumas bactérias patogênicas começaram a mostrar sinais de resistência (GROHMANN; MUTH; ESPINOSA, 2003).

Segundo Yates *et al.* (2004) os genes que caracterizam a resistência em bactérias são comumente transmitidos por plasmídios, transposons, genes cassetes ou outros elementos genéticos móveis, permitindo que a passagem horizontal ocorra entre linhagens, espécies e vários gêneros, através da mobilidade genética existente.

O potencial de transferência dos plasmídios é especialmente significativo pelo fato de que muitas bactérias que contêm plasmídios R, estão associadas com a resistência a antibióticos, e exibindo altos padrões de sobrevivência nos ambientes aquáticos (AZEVEDO, 1998, BAYA *et al.*, 1986, MUDRYK, 2005, PAUL *et al.*, 1991).

Muitas pesquisas têm associado a contaminação aquática ambiental com infecções de *Vibrio* em humanos, sugerindo que a importância do monitoramento sistemático das cepas ambientais se faz necessário para definir seu possível potencial patogênico e sua significância clínica (BAFFONE *et al.*, 2003).

Os víbrios pertencentes à família Vibrionaceae, atualmente apresentando mais de 95 espécies (DSMZ, 2011), são bactérias Gram-negativas, indígenas de ambientes marinho e estuarino. Sua ocorrência e patogenicidade podem ser influenciadas por fatores físicos e químicos, mostrando em alguns casos certa complexidade, e apresentando uma estreita relação com: citotoxinas, enterotoxinas e enzimas lácticas. Pesquisas ressaltam que algumas espécies de víbrios apresentam em seu DNA, genes capazes de produzir toxinas, tais como a hemolisina direta termoestável (TDH), a hemolisina termoestável relacionada (TRH) e a toxina colérica (CTX) (CHAO *et al.*, 2009, GOEL *et al.*, 2010, MASINI *et al.*, 2007).

*Vibrio parahaemolyticus*, habitante de águas costeiras está frequentemente associado a surtos alimentares ocasionados pela ingestão de organismos consumidos crus ou mal cozidos, podendo causar gastroenterites leves ou severas (RIZVI *et al.*, 2006). Enquanto, *V. cholerae* sorogrupo O1 é o agente causador da cólera epidêmica, capaz de causar surtos explosivos em vários locais do mundo (BHANUMATHI *et al.*, 2002, ISLAM *et al.*, 2004).

A ocorrência dos genes que indicam a presença da hemolisina direta termoestável (TDH) e da hemolisina termoestável relacionada (TRH) são indícios de patogenicidade de *V. parahaemolyticus* (ROBERT-PILLOT *et al.*, 2004). Enquanto que, a capacidade de *V. cholerae* causar a cólera é primariamente dependente da expressão de dois fatores de virulência: uma potente enterotoxina conhecida como toxina colérica – CT, e um fator de colonização do pelo, pelo corregulador da toxina – TCP (REEN; BOYD, 2005).

A identificação de isolados de *Vibrio* do ambiente tem sido impreciso e cansativo. Muitas vezes são necessários testes bioquímicos, fisiológicos ou chaves de identificação para melhorar o desempenho dos resultados. Por conta disso, o uso da técnica de Reação de Cadeia de Polimerase (PCR), um dos métodos mais utilizados para a investigação epidemiológica, traz uma maior rapidez e economia, superando as técnicas convencionais utilizadas (REEN; BOYD, 2005, CHARI; DUBEY, 2006, SINGH *et al.*, 2001). O multiplex PCR foi desenvolvido para auxiliar na identificação de cepas epidêmicas de *V. cholerae* que apresentam genes de *ctx* e *tcp* (NANDI *et al.*, 2000).

A tipagem molecular é usada para estudos epidemiológicos fornecendo informações sobre as diferentes cepas bacterianas existentes, a fonte de infecção, os

marcadores moleculares de virulência e os hospedeiros específicos das cepas (CHAO *et al.*, 2009).

Diante do exposto, do ponto de vista ecológico, a diversidade genotípica bacteriana é importante para entender a evolução, adaptação, interação competitiva das espécies e o espalhamento dos genótipos patogênicos (MAHMUD *et al.*, 2007).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Estudar a diversidade do gênero *Vibrio* isolado de quatro estuários no Estado do Ceará, (Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe)

### 2.2 Específicos

- I. Quantificar Coliformes totais e termotolerantes nas amostras de água e de sedimento de quatro estuários no Estado do Ceará, (Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe);
- II. Constituir uma coleção de *Vibrio* presentes em diferentes estuários do Ceará;
- III. Isolar e caracterizar taxonomicamente cepas de *Vibrio* usando técnicas convencionais e de biologia molecular;
- IV. Determinar a susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Vibrio* frente a diferentes antibióticos usualmente empregados na aqüicultura;
- V. Pesquisar fatores de virulência em algumas cepas de *Vibrio* através de testes fenotípicos;
- VI. Pesquisar genes de patogenicidade em cepas de *Vibrio parahaemolyticus* e *V. cholerae* através de testes moleculares.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Estuário e manguezal

O termo estuário deriva do latim “*Aestus*”, que significa maré. Cameron e Pritchard (1963) definem estuário como um corpo de água costeira semi-fechado que tem uma conexão livre com o mar aberto e dentro do qual a água do mar é mensuravelmente diluída na água doce derivada da drenagem terrestre.

Em climas quentes, as vegetações típicas de climas temperados, as gramíneas, são substituídas pela vegetação dos mangues, constituída de árvores de porte relativamente pequeno. O ecossistema manguezal são comunidades de plantas características de lugares abrigados e encharcados que crescem em áreas costeiras, localizados em zonas tropicais e subtropicais ao longo das margens protegidas dos estuários (SOUSA, 2006), apresentando diferentes gradientes ambientais, determinados pela salinidade, formato e tipos de solo resultado da dinâmica flúvio-marinha (URREGO; BERNAL; POLANÍA, 2009), ocupando aproximadamente 181.000 km<sup>2</sup> (ELLISSON, 2000). O Brasil apresenta a segunda maior área de manguezal do mundo e a maior das Américas (GRISI; GORLACH-LIRA, 2010, SOUSA *et al.*, 2006).

O número de espécies vegetal em um manguezal pode chegar a 70, divididas entre 20 e 27 gêneros e variando entre 16 a 19 famílias de plantas (ELLISON, 2000, LI; CHEN, 2009). Sua composição florística pode ser determinada pela tolerância das diferentes espécies ao substrato e às condições salinas existentes, fazendo com que ocorra certa dominância de uma ou várias espécies em determinada área. As raízes das árvores que ficam submersas nos sedimentos podem servir tanto como armadilhas, como para contribuir para o processo de agregação do solo, evitando que ocorra sua erosão (URREGO; BERNAL; POLANÍA, 2009). Sua dinâmica protege contra possíveis inundações, ação das ondas e formação de tempestades com eventos catastróficos tais como a criação de furacões e tufões (LI; CHEN, 2009, WALTON *et al.*, 2007).

Os mangues também são hospedeiros de várias comunidades de vertebrados e invertebrados, servindo muitas vezes como refúgio para animais que tiveram de alguma forma seus *habitats* destruídos ou modificados (ELLISON, 2000).

Cerca de 70% das zonas costeiras têm apresentado além da significância ecológica a sócio-econômica (TAM *et al.*, 1997), trazendo benefícios para a população local: madeira, papel, compostos bioativos tais como o tanino, utilizado para fins medicinais, e frutas comestíveis utilizadas como fonte de alimento (ELLISON, 2000, LI; CHEN, 2009).

Nas últimas décadas, os manguezais estão sofrendo com uma alta exploração do seu espaço para a realização de algumas fontes de trabalho na agricultura, mais especialmente a aquicultura, o cultivo de organismos aquáticos (WALTON *et al.*, 2007). Essa elevada exploração tem ocasionado uma perda na vegetação existente, agravando a diversidade genética, podendo causar um declínio nesse *habitat* (LI; CHEN, 2009, TAM *et al.*, 1997).

A aquicultura no Brasil vem recebendo destaque nos últimos anos, em virtude do aumento de demanda mundial por alimentos de origem aquática, que se deve tanto ao fato de uma expansão populacional como a uma preferência por alimentos mais saudáveis (REBOUÇAS, 2010).

Dentro dessa atividade um grupo de microrganismos que merece destaque é o gênero *Vibrio*, conhecidos por serem importantes patógenos bacteriano de animais cultivados e humanos, porém, Thompson *et al.* (2004) ressaltam que os víbrios desempenham um importante papel na ciclagem de nutrientes dos ambientes aquáticos através do transporte de matéria orgânica dissolvida, apresentam a capacidade de degradar quitina, um homopolímero presente nos oceanos principalmente como principal componente formador do exoesqueleto dos crustáceos e moluscos e algumas espécies ainda possuem a habilidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em sedimentos marinhos impactados por derrames de petróleo.

### 3.2 Antimicrobianos

Inicialmente, foi utilizado o termo antibiose por Vuillemin, em 1889, para definir o processo natural de seleção pelo qual um ser vivo destrói outro para assegurar sua própria sobrevivência. Atualmente, os antimicrobianos podem ser definidos como agentes quimioterápicos que são substâncias químicas utilizadas no tratamento das doenças infecciosas e neoplásicas, em diversas concentrações toleradas pelo hospedeiro (TAVARES, 2007). Podem ser encontrados na forma de compostos sintéticos ou semi-sintéticos, com administração tópica, oral ou parental (KEMPER, 2008).

A quimioterapia que utiliza esses antimicrobianos é uma prática existente em vários locais do mundo, inclusive em toda América do Sul (DEFOIRDT *et al.*, 2007). Caso sejam usados de forma incorreta podem contaminar o meio ambiente através de suas substâncias e derivados (GIRAUD *et al.*, 2006, KEMPER, 2008). Essa contaminação pode ocorrer através do lançamento dos fármacos por meio de descargas de esgotos domésticos ou industriais, podendo alcançar lagos, rios e oceanos (BANERJEE *et al.*, 2007, CABELLO, 2006).

Larsson *et al.* (2007) e Mudryk (2005) relatam que frequentemente são encontrados nos efluentes níveis de antimicrobianos variando de 0,01 a 9,5  $\mu\text{gdm}^3$  na água e de 0,1 a 10,0 mg/kg no sedimento. Enquanto, Hernando *et al.* (2007) e Cabello (2006) confirmam que o sedimento tem sido muito utilizado como material de estudo, por apresentar capacidade de armazenar os resíduos existentes, alterando a microbiota e selecionando os resistentes.

Tradicionalmente, os antimicrobianos têm sido usado na aquicultura, com a finalidade de combater doenças causadas por bactérias (DEFOIRDT *et al.*, 2007), visando o bem-estar dos animais cultivados (HERNANDO *et al.*, 2007). Em contrapartida, essa demasiada utilização tem sido acompanhada de práticas prejudiciais à saúde humana e animal (RANDRIANARIVELO *et al.*, 2010), tendo como exemplo a resistência bacteriana, ocorrendo quando os microrganismos entram em contato com esses fármacos (ALCAIDE; BLASCO; ESTEVE; 2005, DANG *et al.*, 2006, GIRAUD *et al.*, 2006).

Essa resistência pode ocorrer através de contato direto ou indireto, por intermédio de elementos genéticos móveis sendo os plasmídios, transposons, integrons, genes cassetes e bacteriófagos, os mais conhecidos, que podem transmitir a resistência a organismos patogênicos ou não-patogênicos. Esses genes que apresentam resistência podem ser isolados de patógenos humanos, de origem animal ou bacteriana e, apesar da pouca notificação, em bactérias ambientais (HAN *et al.*, 2007, KEMPER, 2008, NONAKA; IKENO; SUZUKI, 2007).

Outro problema detectado pelo uso desses fármacos é o fato de que algumas vezes esses resíduos ficam armazenados nos produtos comercializados, caso de peixes, crustáceos e mariscos, podendo vir a causar alergias e toxicidade (DEFOIRDT *et al.*, 2007).

Um grupo de microrganismo conhecido por atuar como reservatório e veículo de resistência é o gênero *Vibrio*, tal habilidade existe pelo fato deles responderem a pressão seletiva do meio e por serem capazes de espalhar essa resistência através de trocas horizontais do material genético (DANG *et al.*, 2008, DANG *et al.*, 2006, POIREL *et al.*, 2005).

Vários países já realizam pesquisas para avaliar a susceptibilidade antimicrobiana das espécies do gênero *Vibrio* (COSTA *et al.*, 2008a, REBOUÇAS *et al.*, 2011), tendo como as espécies mais estudadas *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* (HAN *et al.*, 2007), *V. alginolyticus* (KRISHNA *et al.*, 2006) e *V. cholerae* (OKUDA *et al.*, 2006).

Entretanto, é necessário que sejam realizados mais estudos na área de ecologia molecular para que se possa entender melhor o impacto que esses genes de resistência causam ao meio ambiente (NONAKA; IKENO; SUZUKI, 2007).

### 3.3 *Vibrio*

Na oitava edição do Bergey's Manual (BUCHANAN; GIBBONS, 1974) foram listadas cinco espécies do gênero *Vibrio*. Atualmente, este gênero compreende mais de 95 espécies (DSMZ, 2011), encontradas em diferentes ambientes, incluindo no oceano profundo. Constantemente, sua taxonomia está sendo alterada e novas espécies vão sendo adicionadas. (IGBINOSA; OKOH, 2008).

Os víbrios são patógenos oportunistas que só causam doenças quando o organismo hospedeiro se encontra estressado ou com sistema imune abalado, sua frequência de infecção pode ser relacionada às diversas condições nos ambientes dos viveiros (DEFOIRDT *et al.*, 2008). Em cultivos, várias espécies são patógenos de vertebrados marinhos e invertebrados (BEM-HAIM; ZICHERMAN-KEREN; ROSENBERG, 2003).

São bactérias Gram-negativas retas ou curvas, halofílicas, móveis com flagelo polar. Não são capazes de formar esporos, sendo anaeróbios facultativos com metabolismo fermentativo ou respiratório. Muitos são oxidase positiva, sendo *Vibrio metschnikovii* uma exceção apresentando oxidase negativa. Todos utilizam o carbono como fonte de energia e ainda são capazes de produzir enzimas extracelulares como gelatinase, amilase, quitinase e DNase (CAVALLO; STABILLI, 2002, IGBINOSA; OKOH, 2008).

São amplamente encontrados na superfície das águas em todo o mundo, ocorrendo em ambientes marinhos ou estuarinos, apresentam um papel importante na ciclagem dos nutrientes, podendo viver de forma livre na água ou muitas vezes em associação com outras espécies, sendo responsáveis por compor a microbiota de bactérias heterotróficas (CAVALLO; STABILLI, 2002, DRYSELIUS; KUROKAWA; IIDA, 2007, REEN; BOYD, 2005)

Várias espécies patogênicas são conhecidas por estarem comumente associadas a surtos de infecções relacionadas ao consumo de alimentos e águas contaminadas por fezes de humanos ou descargas de esgotos (IGBINOSA; OKOH, 2008, JAYASREE; JANAKIRAM; MADHAVI, 2006).

Pesquisas na área ambiental revelaram que parâmetros ecológicos tais como disponibilidade de nutrientes, temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido podem influenciar na presença de *Vibrio* no meio ambiente. Sua detecção fica mais difícil quando a temperatura cai e a salinidade aumenta. Entretanto, vale ressaltar que esses fatores analisados sozinhos são difíceis de ser avaliados (CAVALLO; STABILLI, 2002).

Dentre as espécies existentes algumas merecem destaque por apresentarem elevados índices de mortalidade. *Vibrio cholerae* pode causar doenças através da ingestão de água contaminada. *Vibrio parahaemolyticus*, *V. mimicus* e *V. vulnificus* são habitantes de ambientes estuarinos e marinhos e são frequentemente isolados de frutos e águas do mar. *V. vulnificus* é um patógeno emergente de humanos. Estes organismos podem causar de uma leve gastroenterite até uma septicemia generalizada. Outros vibrios halofílicos como *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* e *V. metschnikovii* são também conhecidos como patógenos de humanos, enquanto que *V. anguillarum* é um patógeno representante de peixes e outros organismos marinhos (IGBINOSA; OKOH, 2008).

### **3.4 Patogenicidade e fatores de virulência**

Surtos de doenças causadas por organismos marinhos têm aparecido em grande escala em todo o mundo e um grande número de infecções bacterianas em humanos tem estado associado a fontes marinhas e ao seu uso de forma recreacional ou comercial. Entretanto, várias atividades econômicas precisam dos ambientes marinhos para sua realização tais como a pescaria, a aquicultura, despejos de esgoto e áreas recreacionais. Com isso o potencial de aparecimento de patógenos emergentes tem aumentado nos ecossistemas. Do ponto de vista ecológico e epidemiológico a ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos é elevada, principalmente em ambientes tais como: rios, estuários e águas marinhas costeiras (IGBINOSA; OKOH, 2008).

### 3.4.1 *Vibrio parahaemolyticus*

*Vibrio parahaemolyticus* é um organismo que preocupa a saúde pública, uma vez que é um patógeno entérico causador de gastroenterite aguda e septicemias em humanos devido ao consumo de alimentos marinhos crus ou mal cozidos que estejam contaminados (BEJ *et al.*, 1999, MAHMUD *et al.*, 2007, WARD; BEJ, 2006). É uma bactéria Gram-negativa, halofílica, distribuída em ambientes estuarinos e marinhos, e em associação com parte da flora natural do zooplâncton (CHAO *et al.*, 2009, LEAL *et al.*, 2008b, ROBERT-PILLOT *et al.*, 2004).

Esse microrganismo está associado com doenças de origem alimentar no Japão desde 1950. Sua incidência aumentou a partir de 1996, nos Estados Unidos, Sudeste da Ásia, Canadá e México (RAHMAN *et al.*, 2006, YANG *et al.*, 2008). No Brasil, ele foi detectado em meados de 1975, na cidade de Cascavel, Ceará, confirmado assim, a primeira referência de *V. parahaemolyticus* no país (HOFER, 1983).

Entretanto de acordo com LEAL *et al.* (2008b) e MAGALHÃES *et al.* (2000) existem poucas notificações de infecções intestinais e colonizações cutâneas, a maioria dos estudos são realizados em estuários, água e sedimento, e em alimentos marinhos.

As infecções por esse *Vibrio* relacionados a alimentos marinhos ocorrem mais comumente no verão, sendo isolados tipicamente em água do mar de regiões temperadas. Quando a temperatura se encontra entre 13° e 15° C, *V. parahaemolyticus* é raramente isolado. Nessas temperaturas, podem entrar em um estado viável mas não cultivável (VMNC), assumindo uma forma cocóide e diminuindo de tamanho, sendo uma maneira de reduzir os gastos usados para a manutenção das células e se proteger de algum estresse ambiental (CHEN *et al.*, 2009).

O início das pesquisas realizadas na área da epidemiologia revelou uma forte associação entre o fenômeno de Kanagawa e surtos de gastroenterites. O fenômeno de Kanagawa é uma beta hemólise induzida pela hemolisina direta termoestável (TDH) que é observada circundando o inóculo em meio ágar sangue, o Agar Wagatsuma, (MARTINEZ-URTAZA, *et al.*, 2004, OKUDA *et al.*, 1997). *V. parahaemolyticus* patogênico ficou conhecido por produzir uma ou as duas hemolisinas, a hemolisina direta termoestável (TDH) e a hemolisina direta relacionada (TRH), presentes nos genes *tdh* e *trh*, respectivamente, e são conhecidas como os maiores fatores de virulência desse microrganismo (CHAO *et al.*, 2009, WARD; BEJ, 2006).

De acordo com Park *et al.* (2000) os genes *tdh* e *trh* apresentam várias atividades biológicas em comum, tais como a atividade hemolítica, enterotoxigenicidade e cardiotoxicidade. Isso ocorre devido ao gene *trh* possuir uma similaridade de 68% na sequência de nucleotídeos relacionado ao *tdh* (BEJ *et al.*, 1999, LEAL *et al.*, 2008a).

Muitas cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de espécimes clínicos manifestam o fenômeno de Kanagawa, sendo consideradas cepas virulentas, o mesmo não acontece com isolados ambientais (OKUDA; NISHIBUCHI, 1998).

De acordo com pesquisas realizadas, a habilidade apresentada por esse vibrio para sobreviver e proliferar em vários nichos tais como meio ambiente, organismos marinhos e intestino humano pode estar relacionado às mudanças ocorridas no ambiente, que de alguma maneira alteraram suas funções e assim causam adaptações do microrganismo ao meio em que se encontra (CHAO *et al.*, 2009).

### 3.4.2 *Vibrio cholerae*

A cólera é uma doença diarreica de forma epidêmica que pode causar ameaça à vida. Geralmente sua transmissão acontece através de fonte fecal-oral (GOEL *et al.*, 2007, NANDI *et al.*, 2000). Essa doença apresenta uma incidência mundial estimada em mais de cinco milhões de casos por ano, com 8% dos casos necessitando de hospitalização e levando a óbito um número em torno de 100.000 pessoas. Em países em desenvolvimento a cólera é um problema de saúde pública (ISLAM *et al.*, 2004, JOELSSON; LIU; ZHU, 2006, PAZZANI *et al.*, 2006).

Um fato que alarmou a população mundial recentemente foi a disseminação de cólera no Haiti. Durante um mês o vibrião colérico foi capaz de matar mais de 1.400 pessoas, algo preocupante para as autoridades, principalmente, porque a doença atingiu todas as províncias do país e as pessoas que apresentaram o vibrião em seu organismo levaram um certo tempo para apresentar os sintomas (WORSNIP, 2010). De acordo com a Agência Informativa Latinoamericana, Prensa Latina (2011), a cifra total de mortos passa de 4.030. Em relatório divulgado pelo Ministério da Saúde do Haiti, até o dia 24 de janeiro de 2011 foram registrados 209.034 contágios.

No Brasil a cólera reapareceu em 1991, após um século de ausência. No período de 1992 a 1994, no Estado do Pernambuco, em amostras de águas de diferentes ecossistemas

aquáticos e de alimentos, foi detectada a presença de *V. cholerae* O1, com predominância do sorovar Inaba sobre o Ogawa (COLAÇO *et al.*, 1998). Em 2001, 168.598 casos foram registrados no país. Desses, 166.357 ocorreram na região nordeste, sendo 31.524 notificados também no Estado de Pernambuco. Durante essa fase epidêmica o vibrião foi encontrado nas águas dos rios das áreas afetadas, fazendo desse Estado uma das áreas mais afetadas pela cólera nessa região (FILIZOLA *et al.*, 2007). Não houve relatos de casos no país em 2002 e 2003. Entretanto, no Estado de Pernambuco, no ano de 2004 foram registrados cinco e em 2005 21 casos (LEAL *et al.*, 2008b). No Estado do Ceará as maiores notificações foram de dezembro de 1991 a setembro de 1993. Nesse último ano ocorreu um surto em Cascavel, CE (HOFER *et al.*, 2001, HOFER, 1983). Em contrapartida, Araújo *et al.* (1996) observaram uma elevada associação entre o *V. cholerae* e copépodos de água doce utilizados no controle de larvas de *Aedes aegypti*, no Estado do Ceará.

*Vibrio cholerae*, uma bactéria Gram-negativa, e agente causador da cólera, é um habitante de ambientes estuarinos, marinhos e de água doce. Portanto, a água tem um papel muito importante na transmissão e ecologia da doença. Esse microrganismo apresenta a capacidade de causar surtos de proporções endêmicas, epidêmicas e pandêmicas (GOEL; JIANG, 2010, GOEL *et al.*, 2007, NANDI *et al.*, 2000).

Desde 1817, sete pandemias com *V. cholerae*, distintas, ocorreram. Não existem informações sobre as cepas de *V. cholerae* que estiveram envolvidas nas quatro primeiras pandemias, enquanto, acredita-se que a quinta e sexta presumivelmente foram causadas pelo *V. cholerae* O1, biotipo Clássico. Em 1961 foi o início da sétima pandemia, considerada a mais extensa de todas, com relação à distribuição e duração, tendo como agente causador *V. cholerae* O1, biotipo El Tor (PAZZANI *et al.*, 2006).

*V. cholerae* é classificado em mais de 200 sorogrupos. Mas, somente os sorogrupos O1 e O139 são os responsáveis por causar a cólera epidêmica (GOEL *et al.*, 2007). Entretanto, têm sido documentados surtos esporádicos e localizados de diarreias causadas por sorogrupos não-O1 e não-O139 de *V. cholerae*. Porém, nos últimos anos muitos estudos têm sido realizados, com o objetivo de alcançar um maior entendimento sobre sua ecologia, patogenicidade e comportamento epidemiológico (FRAGA *et al.*, 2007, SINGH *et al.*, 2001).

A patogênese da cólera é um processo complexo que envolve ações sinérgicas de vários genes (GOEL *et al.*, 2010), merecendo destaque: *ompW*, *ctx*, *tcp* (pelo correolador da toxina), *zot* (toxina zonula occludens) e *rfbO1* (GOEL *et al.*, 2007).

O gene *ompW* é utilizado para auxiliar na identificação genotípica da espécie, uma vez que ele é um marcador genético específico para a espécie *V. cholerae* (GOEL *et al.*, 2007, KUMAR *et al.*, 2009, SHARMA; CHATURVEDI, 2006).

A toxina colérica (TC), uma potente enterotoxina, é supostamente o mais importante marcador epidêmico dentre as várias toxinas produzidas por este vibrio (GOEL *et al.*, 2010, SHARMA; CHATURVEDI, 2006). Essa toxina é codificada por duas subunidades que se encontram no gene *ctx*, *ctxA* e *ctxB*, localizadas no elemento genético CTX, um bacteriófago filamentosos, encontrado no genoma bacteriano (THEOPHILO *et al.*, 2006, KUMAR *et al.*, 2009). O mecanismo molecular que causa diarreia é bem conhecido. A toxina penetra nas células epiteliais do intestino e altera a permeabilidade das membranas para passagem de íons e água. Com o aumento do líquido e o decréscimo da absorção da secreção eletrolítica pode se dar o início da infecção (KIRN; TAYLOR, 2005). Vale ressaltar que o gene *ctx* pode ser encontrado tanto em cepas de *V. cholerae* O1 e O139, como em sorogrupos não-O1 e não-O139 (GOEL *et al.*, 2007).

O gene *tcp* (pelo corregulador da toxina) atua como codificador para os fatores envolvidos na colonização intestinal, agindo como receptor para o bacteriófago filamentosos lisogênico (CTX $\Phi$ ) (SHAKHNOVICH; STURTEVANT; MEKALANOS, 2007) que usa o *tcp* para invadir as células de *V. cholerae* e se instalar no genoma bacteriano (FARUQUE *et al.*, 1998). Em alguns casos, pode infectar cepas de *V. cholerae* não toxigênicas, causando o aparecimento de novas cepas toxigênicas (GOEL; JIANG, 2010, KUMAR *et al.*, 2009, THEOPHILO *et al.*, 2006).

Um gene que também tem sido notificado em surtos diarreicos de cólera é o da toxina zonula ocludens (*zot*) que se encontra localizado na região central do elemento genético CTX (CHAN *et al.*, 2010) e tem como função codificar as proteínas estruturais do bacteriófago CTX $\Phi$  (GOEL *et al.*, 2010) e aumentar a função da permeabilidade intestinal (THEOPHILO *et al.*, 2006).

O gene *rfbO1* está localizado na região 20 kb do fragmento *SacI*, esta região contém todas as informações necessárias para realizar a síntese dos componentes do antígeno O (KUMAR *et al.*, 2009, MANNING *et al.*, 1995).

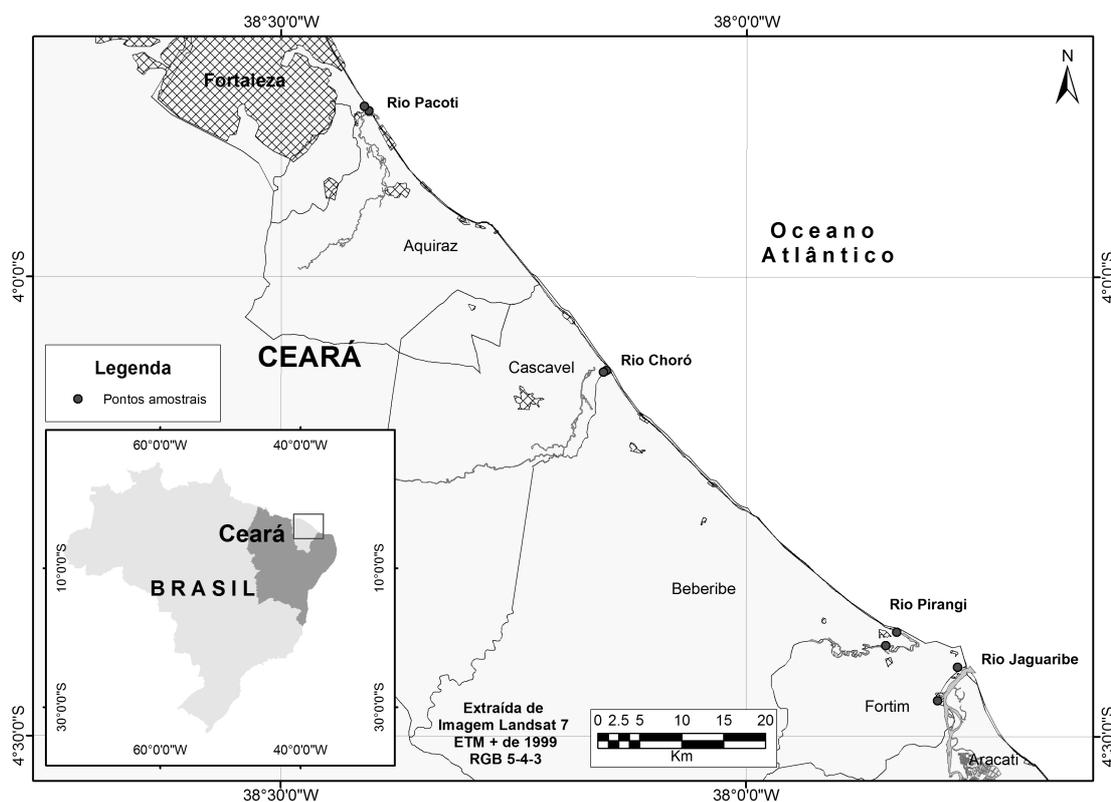
De acordo com Cariri *et al.* (2010) e Fraga *et al.* (2007) quando ocorre a transferência horizontal de genes de virulência por fagos (CTX $\phi$ ) e outros elementos móveis em isolados de *V. cholerae*, cepas de sorogrupos não-O1 e não-O139 classificadas como não epidêmicas, podem atuar como reservatórios desses genes no ambiente podendo vir a ocasionar surtos epidemiológicos futuros ou variantes virulentas.

Entretanto, Theophilo *et al.* (2006) afirmam que em amostras ambientais e clínicas de *V. cholerae* pertencentes ao sorogrupo O26, o cassete de virulência pode se apresentar de forma intacta, contendo o gene *ctxA*, codificador da sub-unidade A da toxina colérica, admitindo-se a hipótese da potencialidade dessas cepas poderem evoluir para estirpes epidêmicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de coleta

As coletas foram realizadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe, no litoral leste do Estado do Ceará, durante os meses de janeiro a abril do ano de 2009, perfazendo um total de 64 amostras, sendo 32 de água e 32 de sedimento. Em cada estuário foram selecionados dois pontos. Um mais próximo do mar e o segundo mais afastado. Os pontos onde foram coletadas as amostras de água e sedimento com suas respectivas coordenadas foram registrados por um GPS da marca Garmin III Plus, e são os seguintes: Pacoti 1 -  $03^{\circ}49'16.6''$  S e  $038^{\circ}24' 11.7''$  W, Pacoti 2 -  $03^{\circ}48'52.4''$  S e  $038^{\circ}24'38.1''$  W, Choró 1-  $04^{\circ}06'07.2''$  S e  $038^{\circ} 09' 01.8''$  W, Choró 2 -  $04^{\circ}06'13.2''$  S e  $038^{\circ} 09' 13.8''$  W, Pirangi 1-  $04^{\circ}23'11.6''$ S e  $037^{\circ} 50' 18.4''$  W, Pirangi 2 -  $04^{\circ}24'03.8''$  S e  $037^{\circ} 51' 00.3''$  W, Jaguaribe 1-  $04^{\circ}25'28.7''$  S e  $037^{\circ} 46' 22.5''$  W, e Jaguaribe 2 -  $04^{\circ}27'39.9''$  S e  $037^{\circ} 47' 39.5''$  W (Figura 1).



**Figura 1** – Mapa das localidades dos quatro estuários, Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará), de onde procederam as amostras de água e sedimento.

## **4.2 Coleta das amostras**

As amostras, provenientes de uma profundidade de 50 cm, foram coletadas em garrafas de cor âmbar de 1 litro de capacidade e previamente esterilizadas. O sedimento foi coletado com coletor de sedimento. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas, contendo gelo, até o laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) –UFC, onde foram processadas, imediatamente.

## **4.3 Determinação dos fatores extrínsecos**

No momento da coleta foi medida a temperatura das amostras de água com auxílio de um termômetro (INCOTERM). Em laboratório foram medidas a salinidade através de um refratômetro da marca ATAGO S/MILL e o pH utilizando-se um potenciômetro da marca MARCONI – PA 200P.

## **4.4 Preparo das amostras**

### **4.4.1 Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais (Ct) e Coliformes Termotolerantes (CT)**

Para determinação do Número Mais Provável de Coliformes Totais (Ct) e Coliformes Termotolerantes (CT), foi empregada a técnica de fermentação em tubos múltiplos, segundo Feng, Weagant e Grant (2002). Esse teste foi dividido em duas etapas: teste presuntivo e confirmatório (Figuras 2 e 3).

#### **4.4.2 Teste presuntivo**

Foram transferidas porções de 1 mL de cada diluição ( $10^0$ ,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  das amostras da água e  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  de sedimento) previamente preparadas com salina 0,85% esterilizada, em três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato (CLS)- Difco, com tubos de Durham invertidos. Em seguida, os tubos foram incubados a 35°C/48 horas. Após esse período, os tubos que apresentaram turvação e produção de gás, foram considerados positivos e submetidos aos demais testes (Figuras 2 e 3).

#### **4.4.3 Teste confirmatório**

Dos tubos que apresentaram resultados positivos no teste presuntivo foram retiradas alíquotas, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, e transferidas para tubos contendo Caldo EC-Difco, com tubos de Durham invertidos. Esses tubos foram incubados a 45°C em banho-maria por 24 horas. A positividade do teste foi verificada pela turvação do meio e produção de gás (Figuras 2 e 3).

O cálculo do NMP foi feito através da consulta à tabela do NMP de acordo com Bacteriological Analytical Manual of the Division of Microbiology - BAM (1984).

### **4.5 Isolamento de *Vibrio* spp.**

#### **4.5.1 Amostras de água**

Para a realização das análises, inicialmente, foi inoculado 1 mL da amostra de água em 9 mL de água peptonada alcalina (APA), pH de 7,5 a 8,5, e depois foram feitas sucessivas diluições decimais de  $10^{-1}$  até  $10^{-4}$  utilizando-se o mesmo diluente (Figura 4).

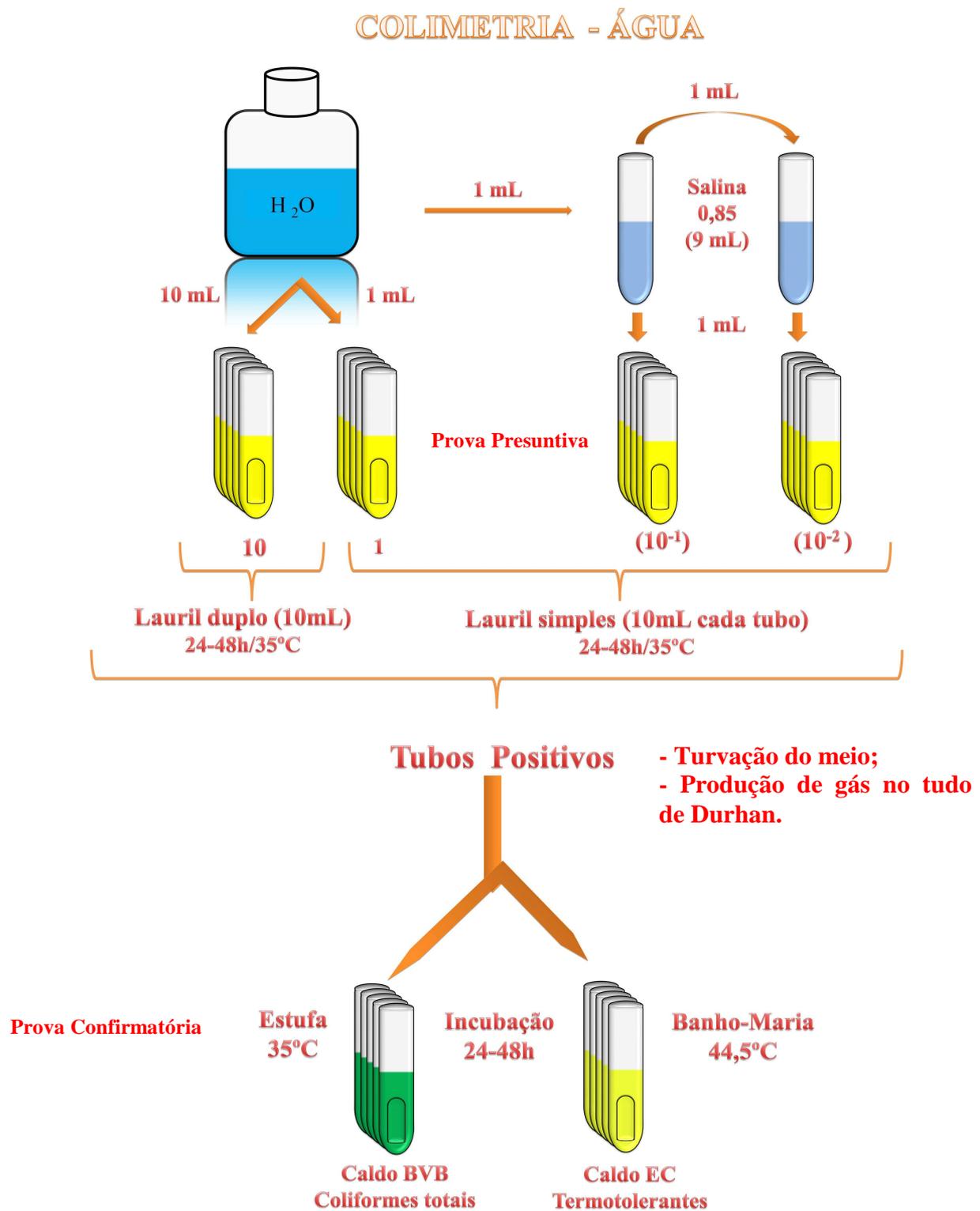
#### 4.5.2 Amostras de sedimento

Para as amostras do sedimento foram pesados 25 gramas e homogeneizados em 225 mL do diluente APA por 30 minutos. A partir da diluição inicial  $10^{-1}$ , foi preparada uma série de diluições decimais ( $10^{-2}$  até  $10^{-4}$ ) utilizando-se o mesmo diluente (Figura 5).

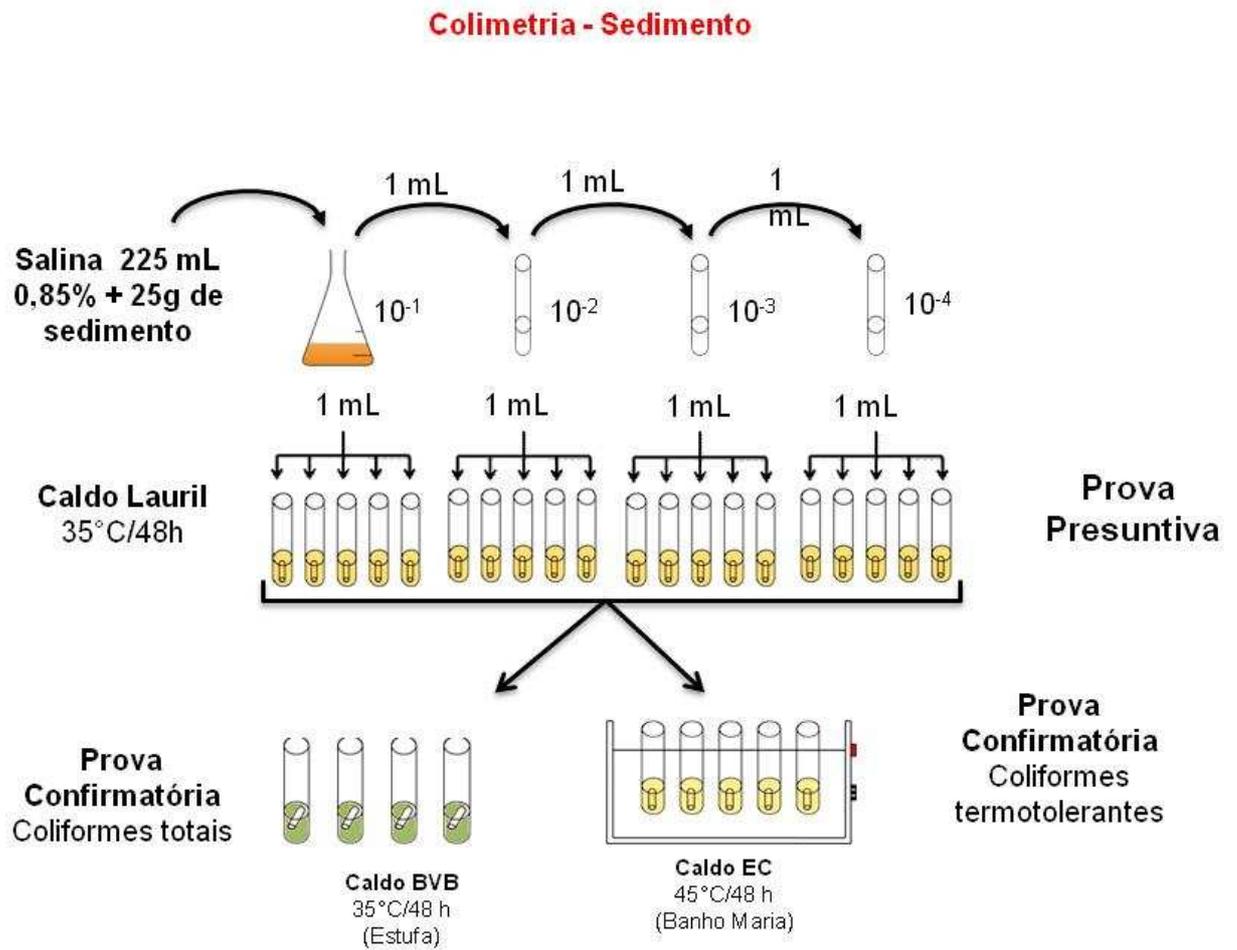
#### 4.5.3 Semeadura inicial das amostras

Das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , previamente preparadas (à imitação das usadas para Colimetria) foram inoculadas porções de 1mL da amostra em tubos contendo APA 1% de cloreto de sódio, em triplicata para as amostras de sedimento e em quintuplicata para as de água, que foram, em seguida, incubadas a 37°C/16-18 horas.

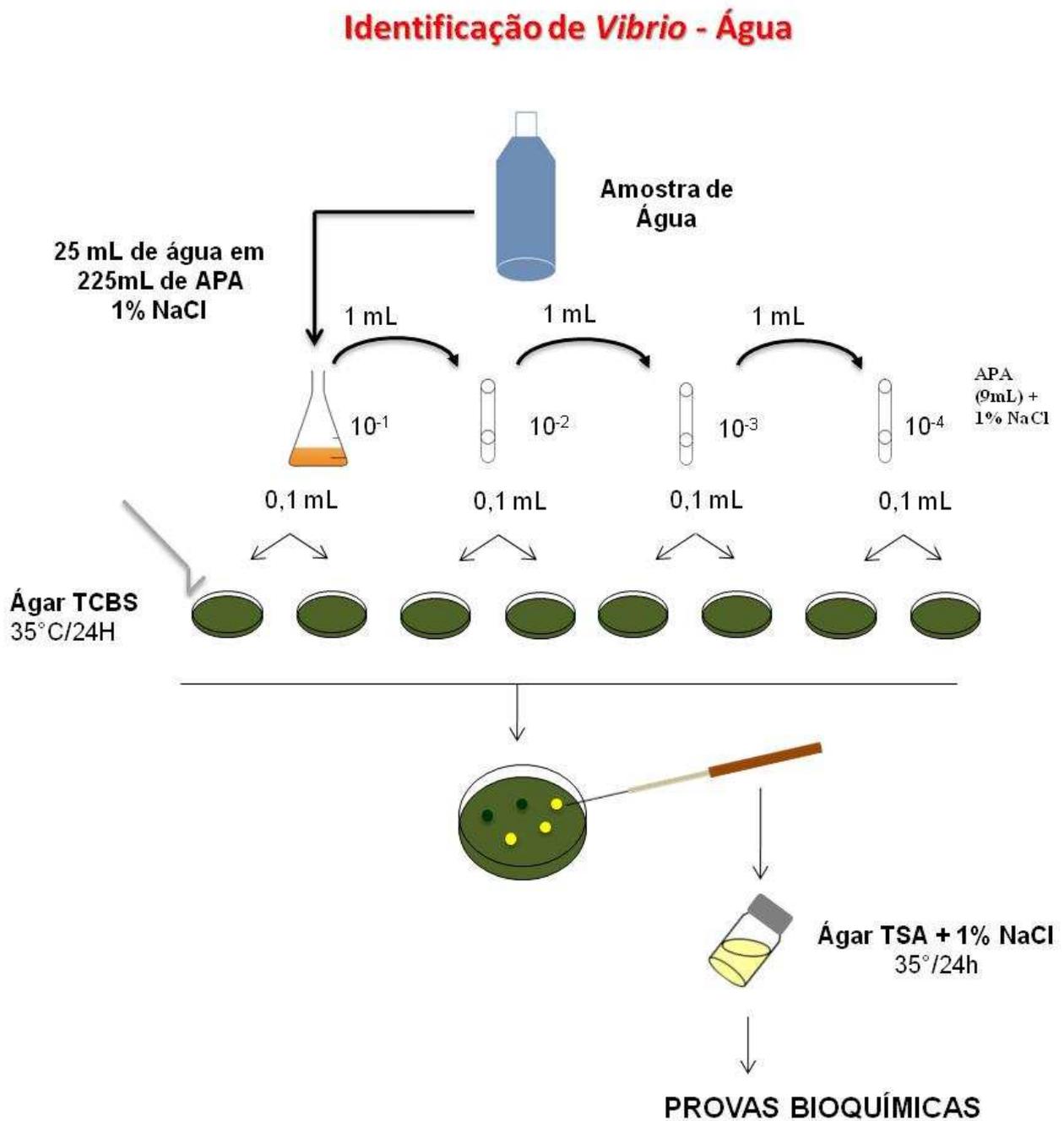
Após o período de incubação foi verificada a positividade dos tubos (turvação) para a confirmação da presença de *Vibrio*. Dos tubos positivos foram retiradas alíquotas e semeadas por estriamento na superfície de placas com o meio Agar Tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS). Foram tomados 0,2 mL, de cada diluição das amostras de água e sedimento, que, em seguida, foram espalhados por toda a superfície do meio com o auxílio de um bastão de vidro em “L” (alça de Drigalski) esterilizado, em duplicata. As placas foram então incubadas invertidas em estufa, onde permaneceram por 18 horas a 37°C (KAYSNER; DEPAOLA, 2010).



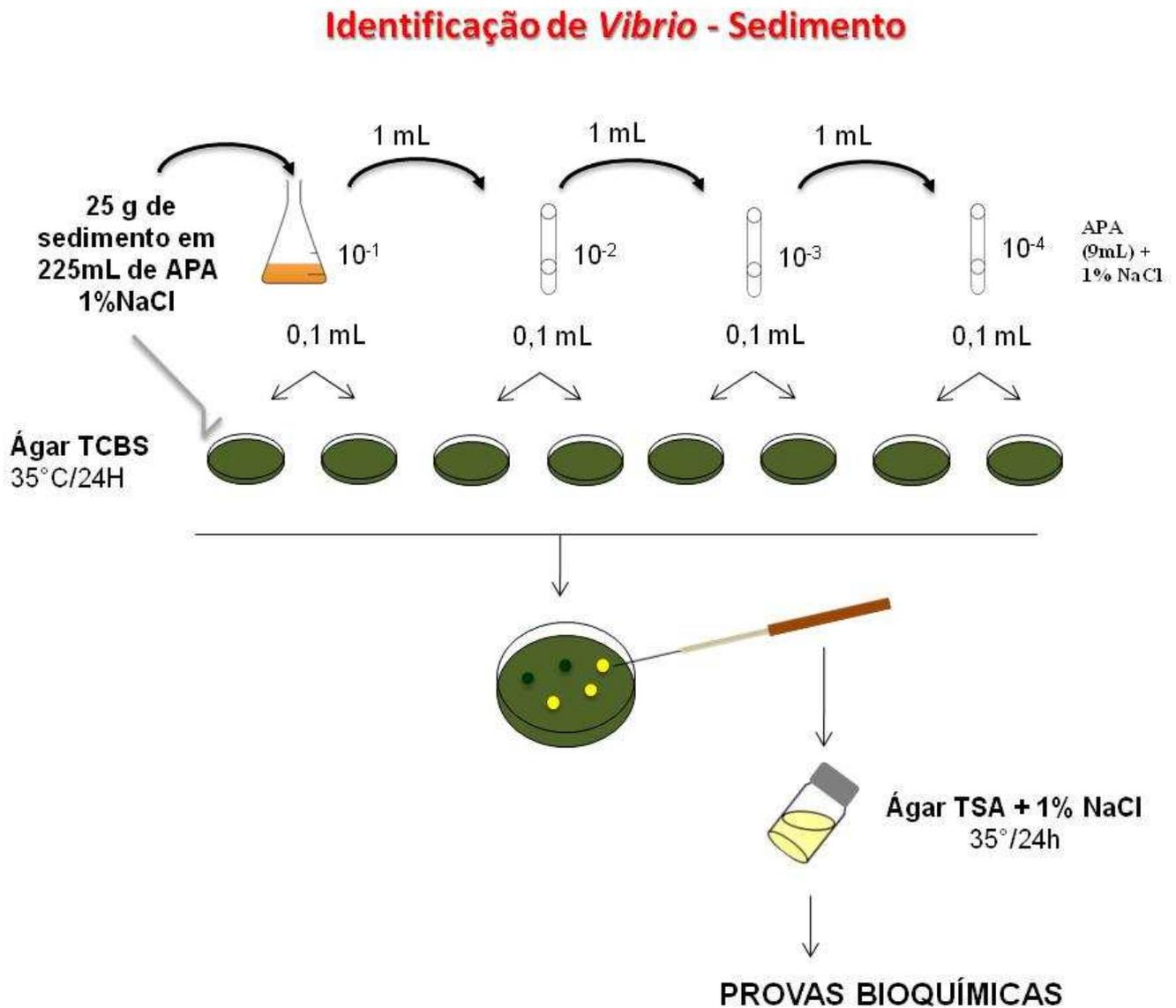
**Figura 2:** Fluxograma da colimetria das amostras de água coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).



**Figura 3:** Fluxograma da colimetria das amostras de sedimento coletados nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).



**Figura 4** - Fluxograma da quantificação e identificação de *Vibrio* isolados das amostras de água coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).



**Figura 5** - Fluxograma para quantificação e identificação de vîbrios isolados das amostras de sedimento coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).

## **4.6 Identificação das cepas suspeitas de *Vibrio* spp.**

As provas bioquímicas de identificação, citadas a seguir, foram selecionadas de acordo com a chave de Nogueroles e Blanch (2008).

### **4.6.1 Identificação presuntiva**

A partir das placas com crescimento de colônias (sacaroses positivas e negativas) foram isoladas de duas a três colônias as quais foram semeadas em tubos de Ágar Triptona Soja-(TSA) - DIFCO adicionado de 1% de NaCl - (TSA) (DIFCO), inclinados, e incubados em estufa por 18-24 horas a 35°C. Decorrido esse período, as culturas crescidas foram utilizadas para a prova de Gram, teste de citocromo-oxidase e motilidade.

#### **4.6.1.1 Coloração de Gram**

Este teste foi utilizado para verificar as características morfológicas das cepas isoladas, em esfregaços corados pelo método de Gram, preparados a partir das culturas de TSA contendo 1% de NaCl. As cepas que se revelassem no esfregaço como bacilos Gram-negativos, polimorfos, encurvados ou não, características de cepas de *Vibrio*, foram levadas para as etapas posteriores da identificação.

#### **4.6.1.2 Prova da produção de citocromo-oxidase**

A partir da cultura em ágar TSA, uma pequena porção do crescimento foi transferida, por meio de uma alça de platina, para uma fita de oxidase. Logo a seguir, foram realizadas as leituras. O teste era considerado positivo quando ocorria o aparecimento da cor violeta na fita de oxidase. A família Vibrionaceae apresenta como característica, o teste da

produção de citocromo – oxidase positivo para a maioria das espécies. Algumas, tais como *Vibrio metschnikovii* são oxidase negativas.

#### **4.6.1.3 Motilidade**

Para o teste de motilidade inoculou-se, com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo longa, tubos contendo o meio semi-sólido Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) (DIFCO), que, em seguida foram incubados por 24 horas a 35°C. O teste positivo é apresentado pelo crescimento ao longo da linha de inoculação com turvação do meio.

### **4.7 Identificação definitiva**

A partir de cada cepa suspeita, inoculada em tubo com ágar TSA adicionado de 1% de NaCl e incubados a 35°C por 24 horas, foram realizados os seguintes testes de identificação:

#### **4.7.1 Prova da Hidrólise da Arginina e Descarboxilação da Lisina e Ornitina**

Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, foi feita a inoculação de cada cepa em três tubos contendo o meio basal, adicionado de 1% de NaCl. Separadamente, foram adicionadas cinco gramas de arginina, lisina e ornitina. Paralelamente, cada cepa foi inoculada em um tubo contendo o mesmo meio basal, porém sem qualquer aminoácido (controle). Após a inoculação, cada tubo foi acrescentado de 1 cm de óleo mineral esterilizado seguido da incubação a 35°C por até 5 dias. O meio inoculado tem viragem para amarelo como resultado da produção de ácido oriundo da glicose existente no meio basal. Quando a reação positiva ocorre, o meio torna-se alcalino, de cor púrpura e, o tubo controle permanece ácido, de cor amarela.

#### **4.7.2 Prova de halofilismo**

Nesta prova a cultura foi inoculada com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, em quatro tubos de Caldo Triptona contendo 0%, 6%, 8% e 10% de cloreto de sódio, respectivamente. Os tubos foram incubados a 35°C/18-24 horas. A positividade do teste é dada pela turvação do meio.

#### **4.7.3 Teste de Voges-Proskauer (VP)**

Nesta prova, tubos contendo o Caldo MR-VP, foram inoculados com a cultura do TSA de 24 horas e em seguida incubados por 48 horas/ 35°C. Após a incubação em cada tubo com crescimento, foram adicionados 0,6 mL de solução alcoólica de alfa-naftol a 5% (Barrit I) e 0,2 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio a 40% (Barrit II). Em seguida os tubos foram agitados e as leituras realizadas até 30 minutos após a adição dos reagentes. Essa prova é positiva quando há formação de uma coloração vermelha.

#### **4.7.4 Teste da hidrólise do Orto-nitrofenil- $\beta$ – D-Galacto-Piranosídeo (ONPG)**

Para a realização desse teste, foram retiradas com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, alíquotas a partir do crescimento em TSA + 1% de NaCl, e transferidas para tubos contendo 0,25ml de uma solução salina 3% esterilizada. Em cada tubo foi adicionada uma gota de tolueno, seguindo-se uma agitação para a liberação da enzima  $\beta$ -galactosidase. Em seguida, os tubos foram colocados em estufa a 37°C/5 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 0,25ml da solução ONPG seguindo-se a incubação dos tubos a 37°C/24 horas. A positividade do teste é evidenciada pela mudança da cor do meio de incolor para amarelo, devido a hidrólise do ONPG por bactérias produtoras da enzima  $\beta$ -galactosidase.

#### **4.7.5 Prova da fermentação de carboidratos**

Para esta prova, as culturas foram inoculadas em quatro tubos contendo Caldo Púrpura de Bromocresol pH  $7,0 \pm 0,2$ , acrescidos de manitol, D-glucosamina e sacarose separadamente. Após a inoculação os meios foram incubados a  $35^{\circ}\text{C}$  por sete dias. A utilização do carboidrato com a consequente acidificação do meio é visualizada pela viragem do meio para amarelo.

#### **4.7.6 Teste de produção do Indol**

As cepas crescidas no meio TSA foram semeadas, por picada profunda, utilizando-se uma agulha de níquel-cromo, no meio SIM (DIFCO), incubadas a  $35^{\circ}\text{C}/48$  horas. Após o período de incubação, foram adicionados 0,2ml do reativo de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldeído). A produção de Indol, oriunda da degradação do aminoácido triptofano presente no meio, é observada pela formação de um anel vermelho sobre a superfície do meio (teste positivo).

#### **4.7.7 Teste de Kanagawa**

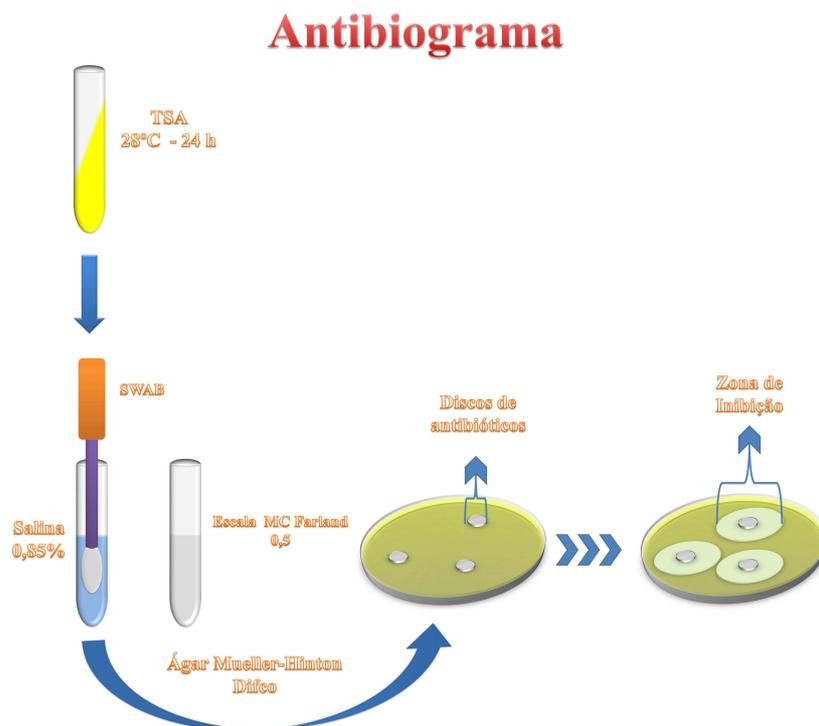
O teste de Kanagawa é realizado através da utilização do Agar base de Wagatsuma que é recomendado para o estudo da patogenicidade presente no *Vibrio parahaemolyticus*, com a utilização de sangue humano (WAGATSUMA, 1968). A positividade do teste é indicada através da formação de um halo com  $\beta$ - hemólise.

#### 4.8 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma das cepas de *Vibrio* isoladas e identificadas foi realizado pelo método de difusão em placa (BAUER; KIRBY; SHERRIN, 1966), seguindo a metodologia proposta por Kirby-Bauer.

Para a realização do antibiograma foi verificada a pureza das culturas em meio Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS). Após a purificação o meio utilizado foi o Agar Mueller - Hinton, recomendado pela CLSI (2010). Os discos de antimicrobianos foram mantidos sob refrigeração numa temperatura de aproximadamente 2°C a 8°C e utilizados dentro do prazo de validade. Antes de serem testados, foram deixados à temperatura ambiente por aproximadamente duas horas.

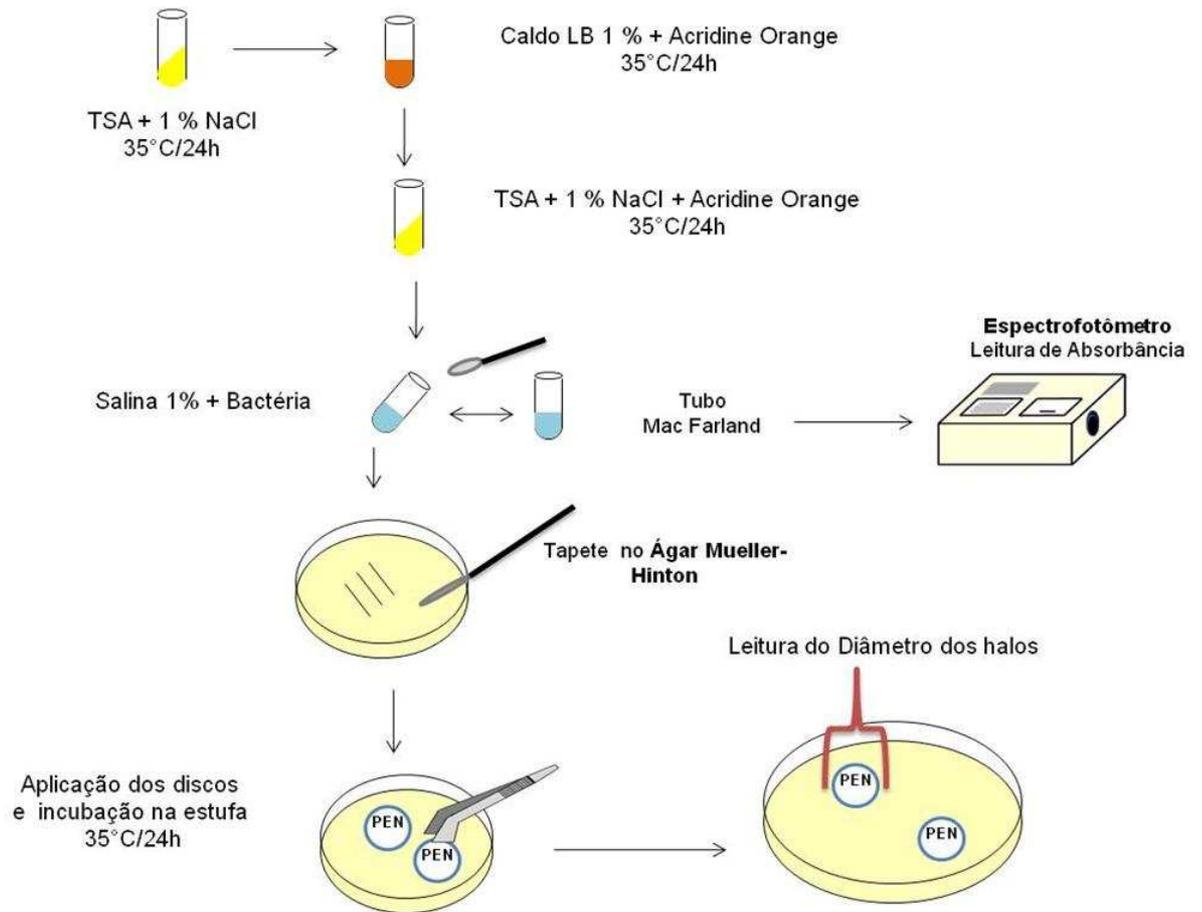
Para o antibiograma foram utilizados discos de susceptibilidade antimicrobianos da marca LABCLIN (Paraná, Brasil), com exceção dos discos de Oxitetracilina-OXI (30g) que foram preparados em laboratório, pertencentes a diferentes famílias: **β-lactâmicos**- Aztreonam-ATM (30μg), Ampicilina-AMP (10μg), Penicilina G-PEN (10Ui), Cefalotina-CFL (30μg), Cefotaxima-CTX (30μg), Ceftriaxona-CRO (30μg); **Aminoglicosídeos** - Gentamicina-GEN (10μg), Estreptomina-EST (10μg); **Cloranfenicol**- Cloranfenicol-CLO (30μg), Florfenicol-FLF (30μg); **Fluorquinolonas**- Ciprofloxacina-CIP (5μg); **Sulfonamidas** - Sulfazotrim-SUT (30μg); **Quilononas** - Ácido Nalidíxico-NAL (30μg) e **Tetraciclina** - Tetraciclina-TET (30μg), Oxitetracilina-OXI (30g), seguindo a orientação técnica ditada pela CLSI (2010). O inóculo inicial foi padronizado por espectrometria (espectrofotômetro da marca Micronal modelo B542) com a leitura no comprimento de onda de 625 nm e então inoculada sobre o Agar Mueller – Hinton, sobre o qual foram inseridos os discos de antibióticos que, posteriormente, foram incubados à temperatura de 37°C /18 a 24h. Decorrido este tempo, procedeu-se a medição dos halos de inibição com o uso de paquímetro. Os resultados foram comparados com os da tabela fornecida pelo laboratório fabricante dos discos. Cepas padrões foram empregadas como controle, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 e *Vibrio cholerae* ATCC 19782 (Figura 6).



**Figura 6:** Fluxograma da técnica do antibiograma realizada com os isolados das amostras de água e sedimento coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).

#### 4.9 Técnica da cura de plasmídeo

As estirpes que apresentaram resistência a mais de um antibiótico foram submetidas à técnica de “cura” de plasmídeo de acordo com Molina-Aja *et al.* (2002) utilizando-se o caldo LB (Luria-Bertani) suplementado com 1% de NaCl e tendo como agente de cura o corante “acridine orange” na concentração de 100 µg/mL. As estirpes crescidas nesse meio durante 24h a 30°C, sob agitação constante, foram novamente submetidas ao teste de antibiograma frente aos antibióticos aos quais se mostraram resistentes. Esse procedimento foi realizado para estabelecer se a resistência das estirpes estava relacionada com o DNA cromossômico ou plasmidial (Figura 7).



**Figura 7:** Fluxograma da técnica da cura de plasmídeo realizada com os isolados das amostras de água e sedimento coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).

#### 4.10 Testes fenotípicos de identificação de fatores potenciais de virulência

Provas fenotípicas para a detecção de fatores potenciais de virulência em estirpes de *Vibrio alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. furnissii*.

#### 4.10.1 Propriedades enzimáticas e hemolíticas das culturas bacterianas

As provas de Gelatinase, Caseinase, Fosfolipase, Lipase, Elastase e atividade hemolítica foram descritas por Austin *et al.* (2005) e Liu, Lee e Chen (1996). As culturas bacterianas a serem testadas e o controle foram crescidos “overnight” em ágar TSA a 1% de NaCL, acrescidos de 0,5% de gelatina, 1% de caseína, 0,2% de gema de ovo, 1% de Tween 80, 1% de elastina e 2% de eritrócitos de carneiro, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa a 35°C/24h. Este tempo poderia ser estendido até 14 dias, caso da prova de Elastase. A formação de um halo indica a positividade das provas. Para a prova da atividade hemolítica a formação de um halo com  $\beta$ - hemólise indica a positividade do teste.

#### 4.11 Identificação genotípica dos isolados

Ferramentas moleculares baseadas no princípio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizadas na investigação da ocorrência de genes de virulência nas cepas identificadas como *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*.

##### 4.11.1 Extração do DNA cromossômico das amostras suspeitas de serem *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*.

Foram selecionadas as estirpes eleitas para o teste e então inoculadas em água peptonada alcalina (APA) 1% e incubadas a 35°C/24h. Do crescimento em APA foi retirado 1,0 mL para iniciar o processo de extração do DNA usando-se o kit comercial Dneasy Tissue (Qiagen). Após a extração uma alíquota de 1,0  $\mu$ L do DNA foi retirada e submetida à análise espectrométrica (comprimento de onda 260 a 280nm) através do espectrofotômetro da marca Thermo (Electron Corporation) para a quantificação do DNA e determinação da eficiência da técnica de extração.

#### 4.11.2 Genes utilizados para as estirpes de *V. parahaemolyticus*

Para a identificação da espécie de *V. parahaemolyticus* foi utilizado o iniciador do gene *tl* (hemolisina termolábil) e para a detecção de sua virulência foram utilizados os iniciadores dos genes *tdh* (hemolisina direta termoestável) e *trh* (hemolisina direta termoestável-relacionada) (BEJ *et al.*, 1999). Os iniciadores foram sintetizados pela *CROMA bioTechnologies* (Brasil) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras de *V. parahaemolyticus*.

Técnica	Genes	Sequencia dos iniciadores (5'- 3')	Condições de Termociclagem	Amplicons (pb) <sup>d</sup>	Fonte
PCR	<i>tl<sup>a</sup></i>	F: 5'-aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg-3' R: 5'-gct act ttc tag cat ttt ctc tgc-3'	94°C/ 3 min. 30 ciclos	450	Bej <i>et al.</i> , (1999)
Multiplex PCR	<i>tdh<sup>b</sup></i>	F: 5'-gta aag gtc tct gac ttt tgg ac-3' R: 5'-tgg aat aga acc ttc atc ttc acc-3'	(94°C/ 1 min., 58°C /1min., 72°C/ 1min.); 72°C/ 5min.	269	
	<i>trh<sup>c</sup></i>	F: 5'-ttg gct tcg ata ttt tca gta tct-3' R: 5'-cat aac aaa cat atg ccc att tcc g-3'		500	

*tl<sup>a</sup>* = hemolisina termolábil; *tdh<sup>b</sup>* = hemolisina direta termoestável ; *trh<sup>c</sup>* = hemolisina direta termoestável-relacionada; (pb)<sup>d</sup> = par de base

#### 4.11.3 Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para as estirpes de *V. parahaemolyticus*.

Em todas as amplificações foi utilizada como controle, uma estirpe de referência: *Vibrio parahaemolyticus* cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz-RJ (IOC 18950). O DNA total extraído foi amplificado pela técnica de PCR para a identificação do gene *tl*, específico para espécie, e multiplex PCR para os genes de virulência *tdh* (hemolisina direta termoestável) e *trh* (hemolisina direta termoestável-relacionada), em termociclador (Techne) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para as estirpes de *V. parahaemolyticus*.

Reagentes da Reação <sup>1</sup>	PCR	PCR (multiplex)	
	<i>Gene específico para espécie</i>	<i>Genes de virulência</i>	
	<i>tl</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>
Tampão 10x	20 mM Tris pH 8,4, 50 mM KCl	20 mM Tris pH 8,4, 50 mM KCl	
dNTP's (2,5 mM)	0,25 µM	0,25 µM	
<i>Iniciador F</i> (10 µM)	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
<i>Iniciador R</i> (10 µM)	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM	1,5 mM	
Taq polimerase (500 U)	4 U	4 U	
Amostra	10 a 60 ng <sup>2</sup>	10 a 60 ng <sup>2</sup>	
Vol. da reação	25 µL	25 µL	

<sup>1</sup>= Cada reação conteve ainda água em QSP o volume final da reação; <sup>2</sup>= A concentração das amostras variaram de 10 a 60 ng.

#### 4.11.4 Genes utilizados para as estirpes de *V. cholerae*

Para a identificação da espécie *V. cholerae* foi utilizado o iniciador do gene *ompW*, e para a detecção de sua virulência foram utilizados os iniciadores dos genes *ctxAB* (toxina da cólera), *tcp* (pelo corregulador da toxina), *rfbO1* (sorogrupo O1) e *zot* (toxina zonula occludens) (GOEL *et al.*, 2007). Os *primers* foram sintetizados por CROMA *bioTechnologies* (Brasil) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras de *V. cholerae*.

Técnica	Genes	Sequencia dos iniciadores (5'- 3')	Condições de Termociclagem*	Amplicons (pb) <sup>f</sup>	Fonte
PCR	<i>ompW</i> <sup>a</sup>	F: 5' –cac caa gaa ggt gac ttt att gtg- 3' R:5' – ggt ttg tcg aat tag ctt cac c - 3'.	94°C/ 10 min.	304	Goel <i>et al.</i> , (2007)
Multiplex PCR	<i>ctxAB</i> <sup>b</sup>	F:5' –gcc ggg ttg tgg gaa tgc tcc aag - 3' R:5' – gcc ata cta att gcg gca atc gca tg - 3'	30 ciclos (94°C/ 1 min., 59°C /1min., 72°C/ 2min.);	536	
	<i>tcp</i> <sup>c</sup>	F:5' – cgt tgg cgg tca gtc ttg- 3' R:5' – cgg gct ttc ttc ttg ttc g - 3'	72°C/ 10min.	805	
	<i>rfbO1</i> <sup>d</sup>	F:5' – tct atg tgc tgc gat tgg tg - 3' R:5' – ccc cga aaa cct aat gtg ag - 3';		638	
	<i>zot</i> <sup>e</sup>	F:5' - tcg ctt aac gat ggc gcg ttt t - 3' R:5' – aac ccc gtt tca ctt cta ccc a - 3'		947	

*ompW*<sup>a</sup> = gene específico para espécie de *V. cholerae*; *ctxAB*<sup>b</sup> = toxina colérica; *tcp*<sup>c</sup> = pelo corregulador da toxina; *rfbO1*<sup>d</sup> = gene de identificação do sorogrupo O1; *zot*<sup>e</sup> = toxina zonula occludens; (pb)<sup>f</sup> = par de base

#### 4.11.5 Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para estirpes de *V. cholerae*.

Em todas as amplificações foram utilizadas como controle, duas estirpes de referência: *Vibrio cholerae* O1 Clássico 569B e *Vibrio cholerae* não-O1 IOC 15.177 cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz-RJ. O DNA total extraído foi amplificado pela técnica de PCR para a identificação do gene *ompW*, específico para espécie, e multiplex PCR para os genes de virulência, *ctxAB* (toxina da cólera), *tcp* (pelo corregulador da toxina), *rfbO1* (sorogrupo O1) e *zot* (toxina zonula occludens), em termociclador (Techne) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para as estirpes de *V. cholerae*.

Reagentes da Reação <sup>1</sup>	PCR	PCR (multiplex)			
	<i>Gene específico para espécie</i>	<i>Genes de virulência</i>			
	<i>ompW</i>	<i>ctxAB</i>	<i>tcp</i>	<i>rfbO1</i>	<i>zot</i>
Tampão (Buffer) 10X	20 mM Tris pH 8,4, 50 mM KCl	20 mM Tris pH 8,4, 50 mM KCl			
dNTP's (2,5 mM)	0,25 µM	0,25 µM			
<i>Iniciador F</i> (10 µM)	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
<i>Iniciador R</i> (10 µM)	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM	1,5 mM			
Taq polimerase (500 U)	4 U	4 U			
Amostra	20 a 35 ng <sup>2</sup>	20 a 35 ng <sup>2</sup>			
Vol. da reação	25 µL	25 µL			

<sup>1</sup> = Cada reação conteve ainda água em QSP o volume final da reação; <sup>2</sup> = A concentração das amostras variaram de 20 a 25 ng.

#### 4.11.6 Visualização do produto da extração e dos amplicons

Os produtos da extração de DNA e do PCR foram submetidos ao método de eletroforese em gel de agarose 1% com adição de Gel Red para visualização dos produtos amplificados em transluminador (Espectroline-UV) com luz ultravioleta. As corridas ocorreram em gel de agarose de sete centímetro com voltagem de 120V, amperagem de 500mA, e duração de 60 minutos. Os géis foram documentados em sistema de fotodocumentação digital Kodak EDAS290. Um 1000 pb DNA ladder (Sigma) foi usado como padrão para o tamanho molecular dos genes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da contagem de Coliformes Totais (Ct) e Coliformes Termotolerantes (CT) na abundância dos vírios nos quatro estuários estudados

A Tabela 5 mostra o Número mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e coliformes termotolerantes (Ctt) das duas amostras coletadas. O NMP de coliformes totais (Ct)/100 mL das amostras de água coletadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe, variou de <0,02 ( $\text{Log}_{10}$  0) a 160,9 ( $\text{Log}_{10}$  2,2), <0,02 ( $\text{Log}_{10}$  0) a 54 ( $\text{Log}_{10}$  1,7), <0,02 ( $\text{Log}_{10}$  0) a 17 ( $\text{Log}_{10}$  1,2), <0,02 ( $\text{Log}_{10}$  0) a 54 ( $\text{Log}_{10}$  1,7), respectivamente. Para as amostras de sedimento coletadas nos mesmos pontos, o NMP/g variou de <3,0 ( $\text{Log}_{10}$  0,4) a 930 ( $\text{Log}_{10}$  2,9), <3,0 ( $\text{Log}_{10}$  0,4) a 23 ( $\text{Log}_{10}$  1,3), <3,0 ( $\text{Log}_{10}$  0,4) a 230 ( $\text{Log}_{10}$  2,3), <3,0 ( $\text{Log}_{10}$  0,4) a 210 ( $\text{Log}_{10}$  2,3), respectivamente. Enquanto, que os dados do NMP de coliformes termotolerantes (Ctt)/100 mL das amostras de água coletadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe, variou de <0,02 ( $\text{Log}_{10}$  0) a 92 ( $\text{Log}_{10}$  1,9), <0,02 ( $\text{Log}_{10}$  0) a 13 ( $\text{Log}_{10}$  1,1), <0,02 ( $\text{Log}_{10}$  0) a 4,9 ( $\text{Log}_{10}$  0,6), <0,02 ( $\text{Log}_{10}$  0) a 4,9 ( $\text{Log}_{10}$  0,6), respectivamente. Enquanto que as amostras de sedimento variaram de <3,0 ( $\text{Log}_{10}$  0,4) a 230 ( $\text{Log}_{10}$  2,3), <3,0 ( $\text{Log}_{10}$  0,4) a 23 ( $\text{Log}_{10}$  1,3), <3,0 ( $\text{Log}_{10}$  0,4) a 230 ( $\text{Log}_{10}$  2,3), <3,0 ( $\text{Log}_{10}$  0,4) a 75 ( $\text{Log}_{10}$  1,8), respectivamente.

**Tabela 5:** Estimativa do número mais provável (NMP) de Coliformes Totais (Ct) e Coliformes Termotolerantes (Ctt) nas amostras de água e sedimento coletadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangí e Jaguaribe.

Coletas	Locais de coleta	Coliformes Totais (Ct)		Coliformes Termotolerantes (Ctt)	
		Água (NMP/ 100mL)	Sedimento (NMP/g)	Água (NMP/ 100mL)	Sedimento (NMP/g)
1 <sup>a</sup>	Pacoti 1	<0,02	<3,0	<0,02	<3,0
	Pacoti 2	<0,02	<3,0	<0,02	<3,0
	Choró 1	<0,02	<3,0	<0,02	<3,0
	Choró 2	<0,02	<3,0	<0,02	<3,0
	Pirangi 1	<0,02	<3,0	<0,02	<3,0
	Pirangi 2	<0,02	<3,0	<0,02	<3,0
	Jaguaribe 1	<0,02	<3,0	<0,02	<3,0
	Jaguaribe 2	<0,02	<3,0	<0,02	<3,0
2 <sup>a</sup>	Pacoti 1	0,79	<3,0	0,04	<3,0
	Pacoti 2	2,3	3,6	1,3	<3,0
	Choró 1	0,11	3,6	<0,02	<3,0
	Choró 2	1,70	<3,0	1,3	<3,0
	Pirangi 1	<0,02	<3,0	<0,02	<3,0
	Pirangi 2	0,33	<3,0	0,07	<3,0
	Jaguaribe 1	0,22	<3,0	0,5	<3,0
	Jaguaribe 2	0,17	<3,0	0,1	<3,0
3 <sup>a</sup>	Pacoti 1	2,2	<3,0	1,3	<3,0
	Pacoti 2	1,10	<3,0	0,1	<3,0
	Choró 1	4,9	9,2	0,1	3,6
	Choró 2	35	3,6	2,7	3,6
	Pirangi 1	1,70	23	0,1	<3,0
	Pirangi 2	13	<3,0	2,2	<3,0
	Jaguaribe 1	3,3	<3,0	0,1	<3,0
	Jaguaribe 2	9,4	150	2,6	7,4
4 <sup>a</sup>	Pacoti 1	24	23	13	<3,0
	Pacoti 2	160,9	930	92	230
	Choró 1	24	23	13	9,2
	Choró 2	54	23	7,9	23
	Pirangi 1	4,9	<3,0	4,9	<3,0
	Pirangi 2	17	230	4,9	230
	Jaguaribe 1	13	<3,0	4,9	<3,0
	Jaguaribe 2	54	210	3,3	75

Nenhum dos valores acima mencionados excedeu o limite proposto pela legislação vigente. O máximo permitido para coliformes na Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) na Classe 1 (seção IV, item i) destinada á avaliação bacteriológica das águas salobras é de 1.000 coliformes termotolerantes por 100

mililitros, em 80% de pelo menos seis amostras coletadas em um período de um ano. No presente estudo o máximo obtido foi de 160,9 NMP/ 100mL para água e 930 NMP/g para o sedimento no estuário do Rio Pacoti (ponto 2). No Brasil inexistem limites para coliformes em sedimento. Vale ressaltar que as coletas foram realizadas em períodos com elevados índices pluviométricos.

Cavallo e Stabili (2002) defendem que a poluição fecal não apresenta uma correlação com a comunidade de *Vibrio* nos estuários. Segundo os autores os víbrios são organismos autóctones do ambiente estuarino e as descargas de esgoto são fontes de patógenos e não de nutrientes. Fato comprovado por Parveen *et al.* (2008) que ao analisarem água e ostras de Chesapeake Bay (USA), com o objetivo de isolar *Vibrio parahaemolyticus*, observaram que de todas as amostras analisadas, de água e ostras, apenas duas do molusco excederam os limites de coliformes.

Em contrapartida, Watkins e Cabelli (1985) mostraram que a densidade do *V. parahaemolyticus* nas águas da Narragansett Bay (USA) foi afetada pela presença de coliformes na água. Os testes estatísticos apresentaram uma correlação positiva entre a densidade de *V. parahaemolyticus* e a contagem de coliformes na água durante o verão, quando a temperatura da água era relativamente constante.

## **5.2 Efeitos dos parâmetros ambientais na abundância dos víbrios nos quatro estuários estudados.**

O resultado da análise das variáveis ambientais está disposto na Tabela 6. A temperatura e a salinidade são os fatores que mais afetam a distribuição dos víbrios (NORIEGA-OROZCO *et al.*, 2007). De acordo com Pfeffer, Hite e Oliver (2003), existe uma correlação positiva entre o gênero *Vibrio* e a temperatura da água e, negativa quando a comparação é feita com o oxigênio dissolvido nas águas dos estuários. A temperatura da água é o parâmetro mais correlacionado com a abundância desses organismos.

Os valores de temperatura da água no presente trabalho variaram de 28 a 36,5°C em todas as amostras coletadas.

Concordando com os autores acima, Panigrahi e Azad (2007) ressaltam que a temperatura é o fator ambiental mais importante, capaz de controlar o crescimento microbiano e quando esses fatores se encontram em condições ideais são capazes de diferenciar os

microrganismos existentes. Experimentos em laboratório mostraram uma correlação positiva entre a temperatura e a atividade metabólica do *Vibrio cholerae* O1, em experimentos realizados em faixas de temperatura entre 10 e 25°C (VITAL *et al.*, 2007).

**Tabela 6:** Valores médios das variáveis ambientais (temperatura, pH e salinidade) obtidas das amostras de água dos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).

Local	Temperatura (°C)				pH				Salinidade (‰)			
	Coletas											
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
Pacoti 1	29	29	30	36,5	7,90	8,12	7,69	7,12	38	39	15	2
Pacoti 2	30	29	31	36,5	7,83	8,11	7,81	7,31	39	40	23	5
Choró 1	30	31	35	35,5	8,22	8,09	8,17	7,06	40	40	30	2
Choró 2	30	34	29	35,5	8,18	8,20	7,91	6,96	40	39	16	2
Pirangi 1	28	29	29	35,5	8,16	8,06	8,20	7,71	40	40	35	5
Pirangi 2	28	30	30	36	7,92	7,81	7,63	7,72	45	48	10	2
Jaguaribe 1	28	29	31	36	7,96	7,97	8,06	7,80	40	29	18	7
Jaguaribe 2	28	30	31	36	8,32	7,89	7,77	7,70	40	23	10	5

Além da temperatura, a salinidade também é um fator limitante para o crescimento dos vibrios. Estudos prévios em laboratórios têm enfatizado a influência desse parâmetro no crescimento dos vibriões, mostrando que algumas espécies aumentam a população em águas caracterizadas como de alta ou moderada salinidade (VITAL *et al.*, 2007).

Na presente pesquisa a salinidade apresentou valores notadamente oscilantes variando de 2,0 a 48,0 nas amostras coletadas dos quatro rios estudados. O que determinou essa variação, principalmente, foi a localização do ponto de coleta e o volume de águas pluviais recebido pelos rios nos períodos das coletas. Vale ressaltar que as amostras foram realizadas nos meses da estação chuvosa (janeiro a abril) no Estado do Ceará, o que explica a enorme flutuação nos valores de salinidade, capazes de causar interferência no isolamento dos microrganismos (Tabela 6).

Em geral, o gênero *Vibrio* tolera uma ampla escala de salinidade, fato comprovado por Eiler, Johansson e Bertilsson (2006) que conseguiram isolar espécies de *Vibrio* em um gradiente de salinidade de 2 a 30,0, valores que corroboram com os resultados do presente trabalho. Ainda, segundo os autores, além da temperatura e salinidade, fatores

ambientais tais como: concentração de fósforo e abundância de dinoflagelados, também são importantes para ajudar em prognósticos sobre a abundância do gênero.

Discordando do que foi dito antes sobre o efeito da salinidade na densidade de víbrios, Sobrinho *et al.* (2010) em estudo recente no Brasil, analisando a correlação existente entre os fatores ambientais e a relevância de *V. parahaemolyticus*, afirmam que a salinidade não apresenta uma correlação com a densidade do víbrio, explicado pelo fato desse parâmetro desempenhar um fator secundário na sobrevivência e no crescimento bacteriano.

As médias dos registros de pH das águas variaram entre 6,96 a 8,32 nos quatro estuários estudados. Esses valores estão dentro do limite exigido para o desenvolvimento dos víbrios, que é de 7,5 a 8,5 (SOUSA, 2004).

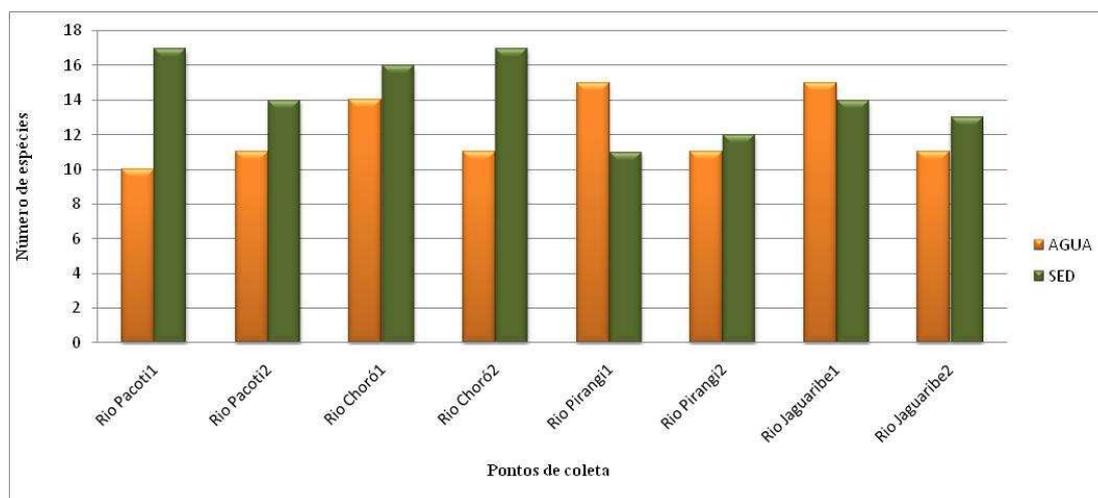
Costa *et al.* (2010) ao analisarem a água do estuário do Rio Acaraú (Ceará, Brasil) observaram que das variáveis ambientais estudadas, o pH foi o parâmetro que mais favoreceu o aumento da microbiota de *Vibrio*. Esses autores discordam de Parveen *et al.* (2008) que afirmam, ao analisarem amostras de água e ostras do estuário de Chesapeake Bay (US), não existir uma correlação do pH com a distribuição do gênero *Vibrio*.

### **5.3 Detecção das estirpes de *Vibrio* spp. em água e sedimento nos quatro estuários estudados**

Os ambientes aquáticos são altamente variáveis e apresentam uma elevada abundância de espécies de diferentes biotas (DRYSELIUS; KUROKAWA; IIDA, 2007). Algumas dessas espécies pertencem ao gênero *Vibrio*, e são bem conhecidas por estarem associadas tanto a surtos alimentares como a contaminação ambiental, podendo, em muitos casos, trazer danos a população.

Foram isoladas 212 cepas de *Vibrio*, sendo 98 provenientes das amostras de água e 114 do sedimento dos estuários estudados.

Na Figura 8 pode ser observada a diversidade dos víbrios isolados da água e do sedimento no ambiente dos quatro estuários analisados, podendo-se constatar que os sedimentos dos Rios Pacoti no ponto 1, local de maior influência da água oceânica, e Choró no ponto 2, localizado na parte mais interna do estuário, foram os locais de isolamento da maior diversidade, em espécies, de *Vibrio* spp.



**Figura 8-** Número de cepas das espécies de *Vibrio* isoladas de água e sedimento coletadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).

Esses dados discordam de Sousa *et al.* (2006) que ao analisarem amostras de água e sedimento dos mesmos pontos da presente pesquisa constataram que as águas do Rio Choró coletadas no ponto 1, e não no ponto 2, foram as que apresentaram maiores variedades de espécies de *Vibrio* spp.

Os quatro estuários analisados apresentam atividade de carcinicultura, sendo que os que se encontram nas proximidades dos rios Choró, Pirangi e Jaguaribe possuem uma quantidade maior de fazendas que o estuário do Rio Pacoti. De acordo com Costa *et al.* (2010) e Das, Khan, e Das (2004) as criações de camarão marinho nos estuários, geralmente, estão associados com descarga de nutrientes e matéria orgânica no ambiente, causando impactos negativos na microbiota nativa.

O segundo local em diversidade de víbrios foi o Rio Pacoti, sendo que algumas das espécies isoladas nesse rio são conhecidas por serem patógenas ao homem. Apesar do Rio Pacoti apresentar somente uma fazenda de carcinicultura, sabe-se que o rio recebe descargas urbanas através de esgotos domésticos e industriais, e apresenta atividades recreacionais em suas águas (SOUSA *et al.*, 2006).

A Tabela 7 apresenta o número de cepas isoladas das amostras ambientais (água e sedimento dos rios), podendo-se observar que o maior índice dos isolados com interesse para a saúde humana e de organismos aquáticos recaiu sobre *Vibrio parahaemolyticus* (67 cepas), seguidos de *V. alginolyticus* (33), *V. coralliilyticus* (26), *V. mimicus* (16), *V. cholerae* não-O1 e não-O139 (9), *V. vulnificus* (5) e *V. furnissii* (4).

**Tabela 7:** Número de cepas das espécies de *Vibrio* detectadas nas amostras de água e sedimento coletadas nos estuários dos rios Pacoti, Choró, Pirangí e Jaguaribe (Ceará).

Espécies de <i>Vibrio</i>	1ª Coleta		2ª Coleta		3ª Coleta		4ª Coleta		Total
	AGUA	SED	AGUA	SED	AGUA	SED	AGUA	SED	
<i>V. parahaemolyticus</i>		1		3	17	23	11	12	67
<i>V. alginolyticus</i>	3	5	8	8	3	3	1	2	33
<i>V. coralliilyticus</i>	11	7	6				2		26
<i>V. mimicus</i>	1				1	1	6	7	16
<i>V. littoralis</i>	5		1	7	2				15
<i>V. diabolicus</i>		5			2	4			11
<i>V. cholerae</i> não-O1 e não-O139					3	1	2	3	9
<i>V. proteolyticus</i>			1	1	1	1		2	6
<i>V. diazotrophicus</i>	1	4						1	6
<i>V. scophthalmi</i>		1			4				5
<i>V. vulnificus</i>				1		1	2	1	5
<i>V. furnissii</i>			1	1	2				4
<i>V. pelagius II</i>		1		1					2
<i>V. nereis</i>		1		1					2
<i>V. ichthyoenteri</i>				1					1
<i>V. hepatarius</i>								1	1
<i>V. fischeri</i>				1					1
<i>V. rumoiensis</i>	1								1
<i>V. natriegens</i>								1	1
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>25</b>	<b>17</b>	<b>25</b>	<b>35</b>	<b>34</b>	<b>24</b>	<b>30</b>	<b>212</b>

Além de *V. cholerae*, muitos outros *víbrios* são reconhecidos como patógenos humanos. *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* e *V. hollisae*, são alguns exemplos de patógenos envolvidos em surtos de origem alimentar ou relacionados com água capazes de causar gastroenterites em humanos (EILER; JOHANSSON; BERTILSSON, 2006).

A espécie que predominou nesse estudo foi *V. parahaemolyticus*, mais abundante no Rio Choró, perfazendo um total de 67 cepas isoladas de água e sedimento dos quatro estuários analisados. Quantidades maiores desse *Vibrio* foram detectadas em temperaturas que variaram de 29 a 36,5°C, com oscilação de salinidade de 2,0 a 35,0. Na quarta coleta ocorreu uma diminuição na salinidade influenciando o número de espécies isoladas. Sob esse aspecto,

Noriega-Orozco *et al.* (2007) afirmam que ao ocorrer um aumento na temperatura, *V. parahaemolyticus* pode se tornar predominante.

Discordando dessa afirmação Sousa *et al.* (2006) ao analisarem amostras de água e sedimentos, nos mesmos estuários desta pesquisa, em temperaturas entre 25 e 30°C, isolaram poucas cepas de *V. parahaemolyticus*.

Estudos epidemiológicos têm mostrado que dentre as espécies de *Vibrio*, *V. parahaemolyticus* é universalmente distribuído, e tem sido isolado de alimentos marinhos, bem como de águas e sedimentos estuarinos, sendo relacionado a distúrbios gastrointestinais ocorridos através da ingestão de alimentos crus ou mal cozidos (LEAL *et al.*, 2008a, MAGALHÃES *et al.*, 2000).

A segunda espécie mais isolada das amostras foi *V. alginolyticus*, com maior abundância no Rio Pacoti. Esse vibrio tem sido reportado como um patógeno de humanos, camarões e frutos do mar. Em alguns casos é usado como probiótico frente a outras espécies do gênero que possuem a habilidade de infectar o camarão marinho. Essa variabilidade inibitória pode afetar outras espécies ou um subgrupo abundante que já exista no local (NORIEGA-OROZCO *et al.*, 2007).

Em trabalhos realizados em fazendas de camarão marinho *V. alginolyticus* está, na grande maioria das vezes, envolvido em epidemias bacterianas, podendo ocasionar infecções entéricas, sistêmicas ou externas (MENDES *et al.*, 2005). Em contrapartida, Mendes *et al.* (2009) investigando a presença de *Vibrio* spp. em isolados de camarão e água de cultivo, de uma fazenda marinha localizada no Estado de Pernambuco, não detectaram a presença de *V. alginolyticus* nas amostras.

É importante lembrar, que embora *V. alginolyticus* seja responsável por elevadas perdas econômicas na carcinicultura, Vieira *et al.* (2009) afirmam que essa espécie, juntamente com *V. damsela* e *V. fluvialis* são indígenas do ambiente e do camarão.

Contudo, como patógeno humano, *V. alginolyticus* assume um importante aspecto epidemiológico, por ser um microrganismo indígena de ambiente aquático e da microbiota de animais marinhos o que o classifica como uma bactéria de fácil acesso a cortes e lesões cutâneas expostas ao ambiente marinho. Rodrigues *et al.* (2001) pesquisando feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa, Maranhão, detectaram por ordem de frequência: *V. alginolyticus* (66%), seguido por *V. parahaemolyticus* (42%) e *V. cholerae* não O1 (9%). Este aspecto torna o patógeno de grande interesse, particularmente para profissionais cujas atividades envolvem aqüicultura, manipulação de alimentos e beneficiamento de pescado (PEREIRA *et al.*, 2007).

O terceiro maior número de espécies isoladas recaiu sobre *V. coralliilyticus*, com 26 cepas identificadas em amostras de água e sedimento dos quatro estuários analisados. Dessas, a maioria (19) foi isolada das amostras de água. Esse microrganismo é conhecido por ser um patógeno de corais, podendo apresentar uma elevada patogenicidade aos recifes. Em alguns casos causa necrose nos tecidos do coral *Pocillopora damicornis* quando incubado em temperaturas entre 27 e 29°C (ARBOLEDA; REICHARDT, 2009, AINSWOTH; HOEGH-GULDBERG, 2008, BEM-HAIM; ZICHERMAN-KEREN; ROSENBERG, 2003, THOMPSON; IIDA; SWINGS, 2004).

Esse vibrião também foi encontrado em amostras de hemolinfa de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, cultivado em quatro fazendas do Estado do Ceará, apresentando valores elevados nos dois períodos amostrados (estio e chuva) (CARVALHO, 2009).

Outra espécie que apresentou um elevado índice de isolamento foi *V. mimicus*, sendo a quarta em abundância. Um total de 16 cepas foram isoladas, oito detectadas em amostras de água e oito nas de sedimento. Esse *Vibrio* pode ser encontrado em águas marinhas, ostras e camarões. Nos últimos, são encontrados, principalmente na fase juvenil, sendo frequentemente isolados em crustáceos considerados saudáveis. Em amostras de hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei*, oriundas de três fazendas de cultivo do Estado do Ceará, Vieira, Vieira e Sousa (2009) obtiveram *V. mimicus* como espécie predominante, tanto no período seco, como no chuvoso. Esses dados concordam com Rebouças *et al.* (2011) que isolaram *V. mimicus* de amostras do hepatopâncreas do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, e de água de viveiros de três fazendas de carcinicultura, na costa do Estado do Ceará, nos estuários dos rios Acaraú, Coreaú e Jaguaribe.

De acordo com Takahashi *et al.* (2007) *V. mimicus* apresenta um alto grau de similaridade com o *V. cholerae*, tendo como característica marcante, o fato de serem patógenos causadores de gastroenterites em humanos. Os sintomas clínicos dessa doença estão associados com uma diarreia aquosa causada por enterotoxinas hemolíticas, produzidas pelas células epiteliais do intestino que afetam o transporte de íons. Isto sugere que este patógeno assim como outras espécies de *Vibrio* (Mizuno *et al.*, 2009) produzem muitos fatores de virulência.

Outra espécie que assume um destacado papel epidemiológico é *V. cholerae*, nesta pesquisa foi encontrado nos quatro rios analisados, comumente isolado de organismos e de ambiente marinhos. Concordando com tal afirmação destaca-se o trabalho realizado por Costa *et al.* (2008b) sobre o estudo de *Vibrio* associado a diferentes estágios de desenvolvimento do

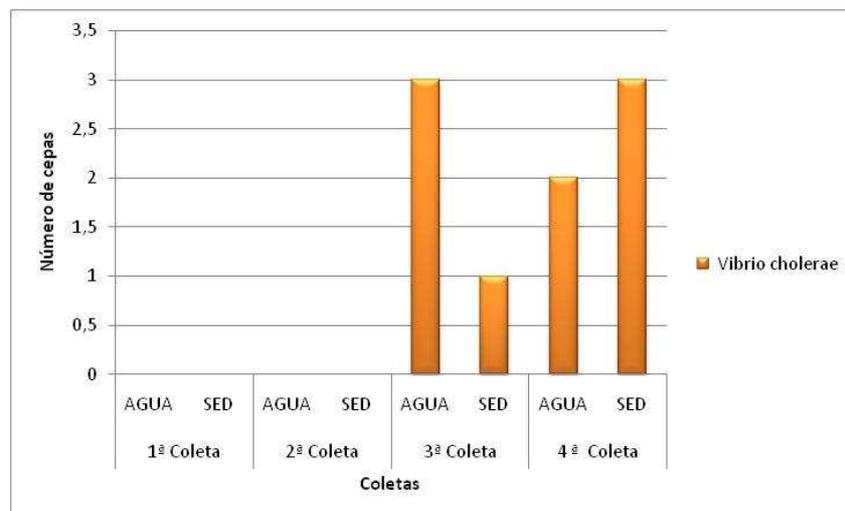
camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*. Dos três estágios estudados (pós-larva, juvenil e adulto), *V. cholerae* foi isolado no de pós-larva e juvenil. Outrossim, Costa *et al.* (2008a) analisando amostras de água de captação, água de viveiro e de camarão *Litopenaeus vannamei* de uma fazenda no litoral Oeste do Estado do Ceará identificaram 12 cepas de *V. cholerae*, dentre 48 outras estirpes de *Vibrio* isoladas .

Costa *et al.* (2010) observaram que em águas do estuário do Rio Acaraú (Ceará), *V. cholerae* foi a segunda espécie em abundância. Esse fato pode ser preocupante, uma vez que Thompson, Thompson e Vicente (2008) ressaltam que esse vibrio é considerado o maior patógeno em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento. Os autores destacam que, no ano de 2006, a cólera chegou a matar mais de 5.000 pessoas em Angola. Esse não é um problema só dos países africanos, o Haiti, atualmente, enfrenta uma epidemia assustadora (Prensa Latina, 2011).

Todavia, Huq *et al.* (2005) afirmam que o papel dos fatores ambientais na ocorrência e transmissão da cólera tem sido estudado para garantir a precisão das previsões existentes. Em trabalho desses autores realizado em Chesapeake Bay (US), o pH elevado das águas apresentou influência sobre a contagem de *Vibrio cholerae*.

Em contrapartida, Araújo *et al.* (1996) ressaltam que além dos fatores ambientais o zooplâncton, especialmente os copépodos apresentam um papel importante na sobrevivência e multiplicação dos víbrios em ambientes aquáticos. Ainda segundo os autores o *V. cholerae* em condições de laboratório foram capazes de se desenvolverem em associação com copépodos dentro de limites de salinidade de 0,27 e pH de 7,5.

Essa afirmação é reforçada por Vieira *et al.* (2009) que reforçam a capacidade que *V. cholerae* O1 possui em sobreviver em águas com baixa salinidade. Tal afirmação concorda com os dados encontrados no presente estudo, uma vez que, as maiores positivities de *V. cholerae* não-O1 e não-O139 observadas foram nas duas últimas coletas, em que os valores de salinidade encontrados foram os mais baixos, com variação de 2,0 a 7,0 (FIGURA 9).



**Figura 9-** Número de cepas de *Vibrio cholerae* não O1 e não O139 detectadas nas quatro coletas realizadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).

*Vibrio vulnificus*, também isolado de água e sedimento nesta pesquisa (Tabela 7), juntamente com *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* é considerado um dos patógenos de alto risco para a saúde pública (AUSTIN, 2010, THOMPSON; IIDA; SWINGS, 2004). Beneduce *et al.* (2010) analisando amostras de mexilhões, água e sedimento do lago Varano, Província de Foggia (Itália), conseguiram isolar *V. vulnificus* durante sete meses de estudo. Segundo os autores, esse vibrião não é responsável por surtos alimentares em humanos, mas pode causar síndromes severas, fatais em cerca de 50 a 60% dos casos. Por esta razão, é considerado um patógeno alimentar de alta mortalidade. Sob outros aspectos Mahmud *et al.* (2007) ressaltam que um pH alto faz com que *V. vulnificus* possa passar do estado cultivável para o viável mas não cultivável. Essa atividade pode trazer uma maior competitividade entre o vibrião e as populações locais.

*V. furnissii*, outro vibrião isolado no estudo, é conhecido por ser uma bactéria de vida livre, que vive em ambientes marinhos e tem sido associada com doenças em enguias e camarões (SRINIVASAN; RAMASAMY, 2009, SUNG *et al.*, 2001). No Brasil ele se destacou por causar danos à saúde pública, podendo ocasionar de leve a severa gastroenterite em crianças e adultos, e em casos mais graves, hemólise das células sanguíneas (AUSTIN, 2010, MAGALHÃES *et al.*, 1993).

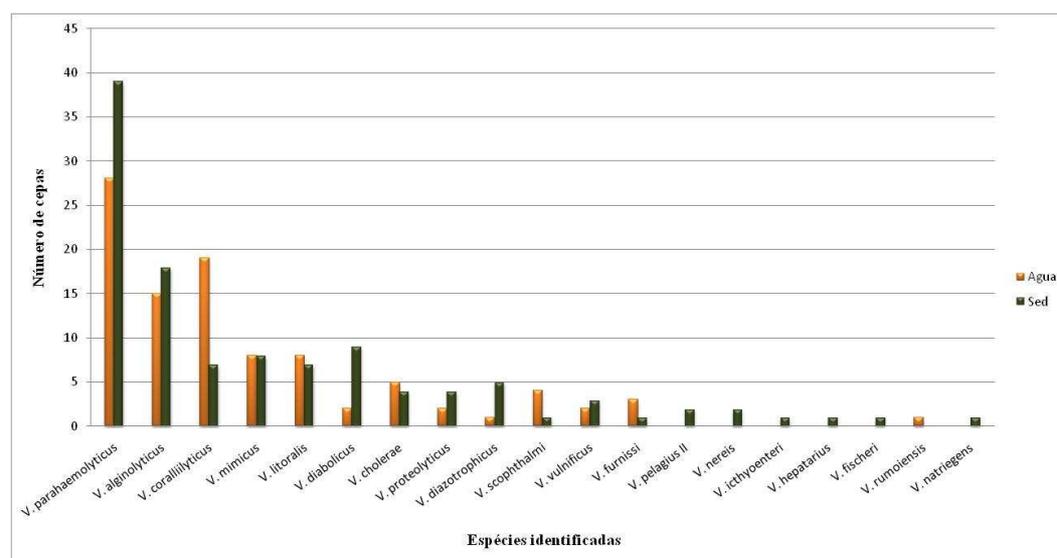
As espécies de *V. ichthyenteri* e *V. fischeri* foram também isoladas em dois estuários, Jaguaribe e Choró, respectivamente. De acordo com Montes *et al.* (2006), *V.*

*fischeri* tem sido encontrado em água do mar de diferentes áreas geográficas, associado à microbiota normal de alguns organismos marinhos, podendo causar surtos de epizootias. Enquanto, que *V. ichthyenteri* tem sido descrito como o agente etiológico de enterites bacterianas de peixes (SUGITA; ITO, 2006).

As amostras com números mais elevados de espécies de *Vibrio* foram encontradas nos sedimentos (114) dos quatro estuários analisados, fato explicado por Kemper (2008). O autor ressalta que o solo é conhecido por ser um vasto reservatório de microrganismos, podendo, nele, ser encontrados números elevados de bactérias, que variam de  $10^6$  a mais de  $10^9$  UFC/g.

A predominância nas amostras dos estuários foi de *V. parahaemolyticus*, seguido por *V. alginolyticus* (Figura 10).

Da mesma forma, Duan e Su (2005) trabalharam com amostras de ostra, água do mar e sedimento na Baía de Two Oregon (USA) e apontaram *V. parahaemolyticus* como a espécie mais isolada em sedimento. Essa espécie foi detectada em 16,7% das amostras do ponto de Tillamook e 31,8% das amostras de Yaquina. Enquanto, que em ostras e água os percentuais de isolamento do *V. parahaemolyticus* foram de 5,6% e 2,7%, e de 11,1% e 27,3%, respectivamente. Segundo os autores a elevada incidência de *V. parahaemolyticus* observada no estudo sugere que o sedimento é o maior reservatório desse vibrião no ambiente marinho.



**Figura 10-** Número de cepas das espécies de *Vibrio* detectadas nas amostras de água e sedimento coletadas nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).

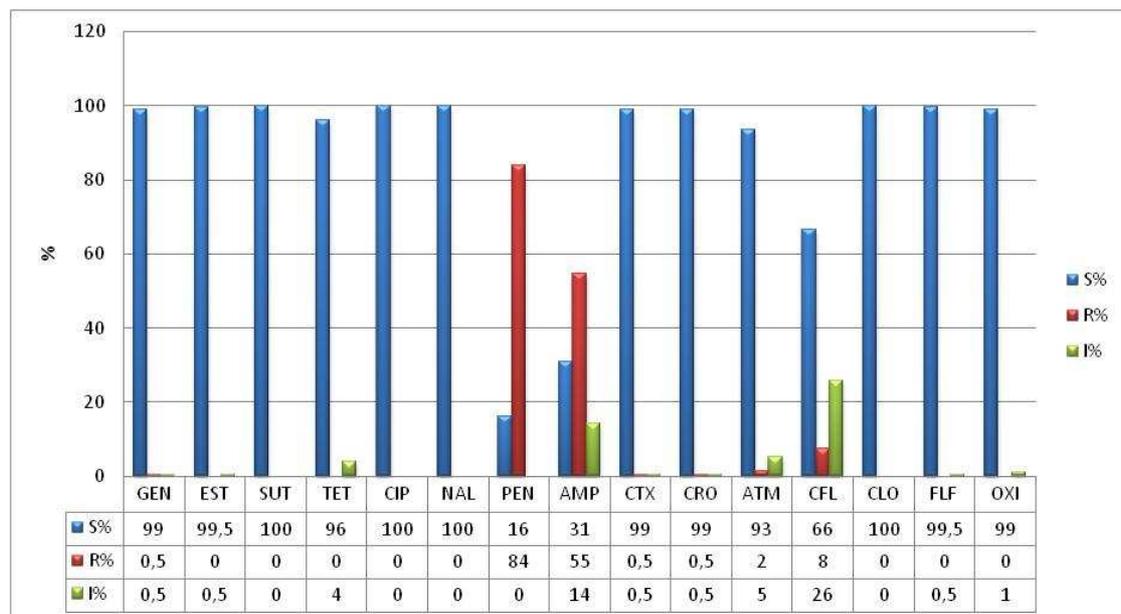
Fato que pode apontar a temperatura como uma das maiores influências, uma vez que, caso ocorra flutuação no clima, esse microrganismo, que se encontra agregado ao sedimento, consegue se multiplicar rapidamente e apresentar níveis elevados no ambiente (DUAN; SU, 2005). Esse fator agregativo que o sedimento apresenta dentre as espécies de víbrios está também ressaltado em trabalho realizado por Harriague *et al.* (2008). Esses autores ao analisarem amostras de água e sedimento marinhos em praias do Mar Adriático (Itália), encontraram uma elevada abundância de *V. alginolyticus* tanto na água, como no sedimento. A detecção desse gênero apresentou uma variação de acordo com o período da coleta. A maior abundância nas águas foi detectada na época da primavera, e no sedimento, no verão.

#### **5.4 Susceptibilidade das cepas de *Vibrio* aos antimicrobianos**

Antibióticos e outros agentes quimioterápicos são, comumente, usados em fazendas de peixe e camarão marinho, como aditivos ou banhos de imersão, dependendo do que se quer se, um efeito profilático ou se terapêutico (DEVI; SURENDRAN; CHAKRABORTY, 2009).

Na Figura 11 é mostrado o percentual de susceptibilidade /resistência das cepas de *Vibrio* isoladas de amostras de água e sedimento dos quatro estuários analisados, frente a diferentes antimicrobianos. O maior percentual de resistência observado foi a penicilina-PEN (83,2%), seguido por ampicilina-AMP (50,7%), cefalotina-CFL (5,5%), aztreonam-ATM (1,5%), cefotaxima-CTX, ceftriaxona-CRO e gentamicina-GEN com (0,5%).

Dos quatro rios analisados, o Rio Choró foi o que apresentou o maior número de cepas resistentes a penicilina (48), seguido do Rio Jaguaribe (42), Rio Pacoti (39) e Rio Pirangi (35). O Rio Jaguaribe foi o que apresentou o maior número (30) de cepas resistentes a ampicilina, seguido do Rio Pirangi (24), e dos Rios Pacoti e Choró (23).



GEN - Gentamicina; EST - Estreptomicina; SUT - Sulfazotrim; TET – Tetraciclina; CIP –Ciprofloxacina; NAL- Ácido Nalidíxico; PEN – Penicilina; AMP - Ampicilina; CTX - Cefotaxima; CRO - Ceftriaxona; ATM – Aztreonam; CFL – Cefalotina; CLO, Cloranfenicol; FLF, Florfenicol; OXI, Oxitetraciclina. S% = Sensível, R% = Resistente, I% = Intermediário,.

**Figura 11.** Percentual de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos de 197 cepas de *Vibrio* spp. isoladas de água e sedimento coletados nos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).

Esses resultados estão de acordo com Kumar, Patterson e Karpagam (2009) que ao analisarem amostras ambientais de água e sedimento marinhos encontraram uma elevada resistência a penicilina e a ampicilina. Segundo os autores, é comprovada a resistência intrínseca de muitas bactérias marinhas, fato preocupante uma vez que essa resistência pode vir a ser repassada para outras bactérias através de elementos genéticos móveis, mais conhecidos como plasmídios, transposons e integrons. É importante ressaltar que esse caráter pode também ser passado das bactérias marinhas para outros microrganismos existentes nos estuários.

Rebouças *et al.* (2011) relatam um estudo feito com 31 cepas de *Vibrio*, isoladas de água de viveiro e de camarão marinho, em fazendas de carcinicultura. Dessas, 14 foram resistentes a ampicilina, seguidas de oxitetraciclina (8), cefoxitina (6), tetraciclina (4) e ácido nalidíxico (2). Outrossim, também foram encontrados valores elevados de vîbrios resistentes a ampicilina isolados de camarões marinho, *Litopenaeus vannamei*, e de águas de captação em fazendas de carcinicultura (COSTA *et al.* 2008a). De acordo com os autores a presença de estirpes de *Vibrio* resistentes a antimicrobianos, na aquíicultura, vem sendo relatada há algum tempo.

Apesar da baixa incidência de cepas resistentes aos antimicrobianos cefalotina – CFL (5,5%), aztreonam- ATM (1,5%), cefotaxima – CTX, ceftriaxona – CRO e gentamicina- GEN (0,5%), suas detecções indicam que de alguma maneira o ambiente está tendo contato com eles. Essa disseminação pode com o passar do tempo representar riscos para as populações bacterianas existentes. Aztreonam- ATM (1,5%), cefotaxima – CTX e ceftriaxona – CRO fazem parte da classe dos  $\beta$ -lactâmicos. Elevados valores de resistência a essa classe têm sido detectadas em ambientes aquáticos no Chile - Miranda e Zemelman (2002) e Austrália- Akinbowale, Peng e Barton (2006) ao estudarem amostras de diversas fontes de aquicultura, peixes, crustáceos e água. De 62 amostras de *Vibrio* spp. mais da metade (54,8%) foram resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos utilizados, 41,4% a cefalexina e 23,1% a cefalotina, valores mais elevados que o da presente pesquisa.

A baixa resistência dos  $\beta$ -lactâmicos apresentados nesta pesquisa discorda de Pontes *et al.* (2009) que afirmam que essa classe é frequentemente usada no combate a muitas bactérias Gram-negativas. Segundo os autores, uma elevada resistência ocorre devido à produção de  $\beta$ -lactamases, encontrada em cromossomos, plasmídios, transposons e integrons e que, os estudos com essas enzimas têm sido utilizados para a investigação da disseminação de resistência em isolados clínicos.

Apesar dos v́brios terem apresentado um baixo percentual de resistência a gentamicina-GEN (0,5%), o uso de aminoglicosídeos, classe a qual pertencem gentamicina e a estreptomicina, deve ser evitado, uma vez que eles apresentam um elevado grau de toxicidade (ARAUJO *et al.* 2007). A Índia foi um dos países que proibiu o uso desse fármaco em sistemas de cultivo (JAYASREE; JANAKIRAM; MADHAVI, 2006).

Nenhuma cepa foi resistente ao cloranfenicol. Esse antimicrobiano é proibido em alimentos pela comunidade europeia (MENDES *et al.*, 2004) e pelo Brasil (MAPA, 2003). O motivo dessa proibição é que o uso desse antimicrobiano apresenta sérios efeitos, capazes de causar anemia (RAHAMN *et al.*, 2010).

Das 197 cepas que apresentaram resistência à ampicilina e à penicilina, 25, quando submetidas a cura dos plasmídios, continuaram resistentes aos dois antimicrobianos (ampicilina e penicilina) representados por sete cepas de *V. parahaemolyticus*, cinco de *V. coralliilyticus*, cinco de *V. littoralis*, cinco de *V. alginolyticus*, duas de *V. proteolyticus* e uma de *V. diabolicus*. Esses resultados discordam de Molina-Aja *et al.* (2002) que afirmam que, quando isolados de *Vibrio*, resistentes a esses antimicrobianos são submetidos a cura dos plasmídios perdem esse caráter.

Devi, Surendran e Chakraborty (2009) ao estudarem o perfil plasmidial de isolados de *V. parahaemolyticus*, amostrados de fazenda de carcinicultura da costa da Índia, observaram que a resistência antimicrobiana antes e após a cura persistiu para antimicrobianos tais como: ampicilina, polimixina B, estreptomicina, kanamicina, neomicina, clorotetraciclina e furazolidone. Esses resultados reforçam o que Smith (2007) afirma sobre os plasmídios possuírem a capacidade de carrear uma variedade de genes de resistência, incluindo uma resistência codificada à ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, sulfonamidas, estreptomicina e a tetraciclina.

Da mesma forma, Hofer *et al.* (1999) e (2001) ao realizarem trabalho entre isolados de *V. cholerae* e de *Escherichia coli*, observaram através da transferência de plasmídios multiresistentes, a capacidade que os mesmos possuem em repassar essa resistência a outras estirpes bacterianas. Porém, Campos *et al.* (2004) discordam das discussões acima afirmando que a resistência plasmidial é dificilmente encontrada entre cepas de *Vibrio*, e quando isso ocorre outros determinantes são os responsáveis.

Randrianarivelo *et al.* (2010) recomendam que os antimicrobianos devem se restringir apenas ao uso terapêutico, e que o enfoque preventivo pode ser mais caro do que os tratamentos posteriores. Por conta disso, quem trabalha com aquicultura deve usar outras estratégias para controlar as infecções. Sob outros aspectos, vale ressaltar que a contaminação de fontes de água com resíduos de antimicrobianos pode ser responsável por infecções de difícil tratamento e constituir um risco à saúde pública (COSTA *et al.*, 2008c).

### **5.5 Detecção de fatores de virulência e propriedades enzimáticas e hemolíticas das culturas bacterianas patogênicas humanas**

O perfil de virulência das cepas de *Vibrio* isoladas dos estuários e escolhidas por serem patogênicas ao homem (*V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. furnissii*) estão apresentados na Tabela 8.

Dentre os quatro rios analisados o que apresentou o maior número de cepas potencialmente virulentas nas amostras de água, foi o Rio Pacoti (11), seguido dos rios Pirangi (9), Choró e Jaguaribe (6). Enquanto que, para as de sedimento a ordem foi: Rio Pacoti e Pirangi apresentando nove cepas positivas (9), seguidos do Rio Jaguaribe (7) e Rio Choró (4).

**Tabela 8:** Perfil dos fatores de virulência apresentados pelas espécies potencialmente patogênicas ao homem de *Vibrio* spp. isoladas de água e sedimento dos estuários dos Rios Pacoti, Choró, Pirangi e Jaguaribe (Ceará).

Local de coleta	Amostra de origem	Perfil de virulência						<u>N</u>	<u>n</u>	Espécies identificadas
		Gl	Et	Cs	Ff	Lp	Hm			
Choró	Água	+	-	-	+	-	β	1	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	-	-	1	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	-	-	1	1	<i>V. mimicus</i>
		+	-	+	+	+	β	1	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	+	+	+	+	β	2	2	<i>V. mimicus/V. cholerae</i>
	sedimento	+	-	-	+	-	-	3	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	+	+	+	-	1	1	<i>V. mimicus</i>
Jaguaribe	água	+	-	-	+	+	-	3	2	<i>V. alginolyticus/V. vulnificus</i>
		+	-	-	+	-	-	1	1	<i>V. mimicus</i>
		+	+	-	+	+	β	2	2	<i>V. mimicus/V. cholerae</i>
	sedimento	-	-	-	+	-	-	1	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	+	-	2	2	<i>V. alginolyticus/V. vulnificus</i>
		+	+	-	+	-	-	1	2	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	-	-	3	3	<i>V. mimicus/V. alginolyticus/V. vulnificus</i>
Pacoti	agua	+	-	-	+	-	-	2	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	+	β	1	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	-	β	1	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	+	-	1	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	+	+	+	+	β	1	1	<i>V. mimicus</i>
		+	-	-	+	+	-	2	1	<i>V. mimicus</i>
		+	+	-	+	+	β	1	1	<i>V. cholerae</i>
		+	-	-	+	+	β	1	1	<i>V. cholerae</i>
	sedimento	+	-	+	+	-	β	1	1	<i>V. furnisii</i>
		+	-	-	+	-	β	1	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	-	-	3	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	+	-	3	3	<i>V. alginolyticus/V. mimicus/V. cholerae</i>
		+	-	-	+	-	-	2	1	<i>V. mimicus</i>
Pirangi	água	-	-	-	-	-	-	1	1	<i>V. furnisii</i>
		+	-	-	+	-	β	2	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	-	-	3	2	<i>V. alginolyticus/V. cholerae</i>
		+	-	-	+	+	-	1	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	+	+	+	β	2	2	<i>V. mimicus/V. vulnificus</i>
	sedimento	+	-	-	+	-	-	2	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	-	-	+	+	β	1	1	<i>V. alginolyticus</i>
		+	+	-	+	+	β	2	2	<i>V. alginolyticus/V. cholerae</i>
		+	-	+	+	+	β	1	1	<i>V. mimicus</i>
		+	+	+	+	+	β	2	2	<i>V. mimicus/V. cholerae</i>
		+	-	-	+	-	β	1	1	<i>V. cholerae</i>

Gl: Gelatinase; Et: Elastase; Cs: Caseinase; Ff: Foslipase; Lp: Lipase; Hm: hemólise; β = beta hemólise; N: número de isolados apresentando o perfil; n: número de espécies

Das 212 cepas de *Vibrio* isoladas de amostras de água e sedimento o maior percentual de positividade foi para fosfolipase (98%), seguido pela gelatinase (96%), lipase (49%), atividade  $\beta$ -hemolítica (39%), e caseinase e elastase com (18%) (Tabela 4). Os resultados encontrados se assemelham aos de Masini *et al.* (2007) entre isolados de víbrios originados de amostras de água em um balneário na Itália. Nessa pesquisa, os autores observaram um percentual elevado de positividade para a gelatinase (86%), seguida da elastase (73%), lipase (54%), protease (14%), urease (7%) e atividade hemolítica (3%). Também verificaram que a presença de elastase, lipase, urease e atividade hemolítica não se mostraram específicas para espécies enquanto que, a produção de gelatinase e protease estiveram relacionadas as espécies *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*. Em nossa pesquisa, a atividade da fosfolipase foi relacionada a todos os isolados das espécies *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. cholerae* e *V. furnissii*, enquanto que a gelatinase foi relacionada aos isolados das espécies *V. mimicus*, *V. cholerae* e *V. furnissii* sendo considerada então, espécie-específica (TABELA 9). No total de isolados apenas duas cepas (uma de *V. alginolyticus* e outra de *V. furnissii*) não produziram essa enzima (TABELA 8).

**Tabela 9:** Percentual de positividade na caracterização enzimática dos isolados de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos a humanos.

Espécies bacterianas ( <i>n</i> )	Percentual das Provas de virulência (%)					
	Ff	Gl	Lp	Cs	Et	Hm
<i>V. alginolyticus</i> (31)	100	96	32	3	6	29
<i>V. mimicus</i> (15)	100	100	66	40	26	40
<i>V. cholerae</i> (9)	100	100	77	22	55	77
<i>V. vulnificus</i> (4)	100	100	75	25	0	25
<i>V. furnissii</i> (2)	50	50	0	50	0	50

Gl: Gelatinase; Et: Elastase; Cs: Caseinase; Ff: Foslipase; Lp: Lipase; Hm: hemólise;  $\beta$  = beta hemólise; *n*: número de espécies

Lafisca *et al.* (2008) analisaram cepas de *Vibrio* isoladas de moluscos bivalves coletados na Itália (Lagoa de Venice) e no Brasil (Baía de Guanabara), quanto à frequência de elastase, colagenase e condroitinase. Os autores encontraram nas amostras brasileiras altas quantidades de cepas com produção de elastase (23), colagenase (22) e condroitinase (21). Os autores ressaltam que essas enzimas são consideradas os principais fatores de virulência da bactéria *V. alginolyticus*, especialmente, em casos de infecções dermatológicas humana.

Lafisca et al. (2008) provaram através de técnicas moleculares que esse *Vibrio* pode adquirir os genes de virulência de outras bactérias marinhas, servindo como reservatório patogênico.

Das 61 cepas analisadas 24 (39%) foram  $\beta$ -hemolíticas, dessas, nove (14%) eram *V. alginolyticus*, seguidas por sete (11%) de *V. cholerae*, seis (9%) de *V. mimicus* e somente uma cepa (1%) de *V. vulnificus* e *V. furnissii*. De acordo com Jayaprakash *et al.* (2006) a hemólise pode ser considerada um determinante virulento, e as propriedades quitinolíticas, proteolíticas e lipolíticas podem servir como fatores de suplemento que irão somente ajudar o organismo a invadir o hospedeiro. Por outro lado, Austin *et al.* (2005) afirmam que o ambiente de aquicultura serve como um reservatório ideal para as linhagens virulentas dos víbrios, sendo rico em nutrientes e antibióticos, fazendo com que ocorram condições ideais para esses microrganismos se desenvolverem.

Espécies conhecidas como *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. harveyi* e *V. proteolyticus* têm sido isoladas de etapas larvais de camarões. Dentre essas espécies *V. alginolyticus* merece destaque por ser, frequentemente, responsável por doenças em camarões peneídeos, sendo descrito como o principal patógeno tanto para peneídeos como para não-peneídeos (JAYAPRAKASH *et al.*, 2006).

Além disso, Masini *et al.* (2007) ressaltam que a citotoxicidade e as atividades enzimáticas não são vistas apenas em isolados de espécies de relevância clínica como *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. harveyi*, mas também em cepas consideradas não patogênicas a humanos tais como *V. mediterranei*, *V. splendidus*, *V. campbelli* e *V. salmonicida*.

## 5.6 Identificação genotípica dos isolados

### 5.6.1 Detecção de *V. parahaemolyticus* em água e sedimento por PCR e multiplex PCR

Na Tabela 10 estão dispostos os resultados das reações de PCR e multiplex PCR das 64 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas das amostras de água e sedimento dos quatro estuários e que mostraram positividade para o gene *tl*. Sessenta e três (98%) dos isolados identificados fenotipicamente como *V. parahaemolyticus* foram confirmados com a utilização

dos iniciadores específicos para esta espécie. Quando utilizados iniciadores específicos para as toxinas foi verificada positividade em 54 (84%) para o gene *tdh* e 19 (29%) para *trh*. O percentual de estirpes que apresentaram ambos os genes foi de 29%. Apenas 10 (15%) amostras foram negativas para o gene *tdh* e 35 para o *trh*.

Uma análise da distribuição das estirpes de acordo com o estuário de origem mostra que o maior número de cepas de *V. parahaemolyticus* com genes codificadores das toxinas *tdh* e *trh* foi isolado nos rios Jaguaribe e Choró, seguidos pelos rios Pacoti e Pirangi. Quanto ao tipo de amostra, o maior percentual das cepas *V. parahaemolyticus* apresentando os genes *tdh* e *trh* foram obtidas das amostras de sedimento. Das 36 cepas analisadas, 36 foram positivas para o gene *tl*, seguida de 36 para o *tdh*, 12 para o *trh* e 12 para o *tdh* e *trh*. Enquanto que para as amostras de água foram 27 positivas para o *tl*, seguida de 25 para o *tdh*, 8 para o *trh* e 8 para o *tdh* e *trh*. Já para o fenômeno de Kangawa foram 34 positivas para o sedimento e 24 para as amostras de água (TABELA 11).

**Tabela 10:** Resultado do teste hemolítico do fenômeno de Kanagawa, reação de urease, gene de identificação da espécie do *Vibrio parahaemolyticus* e seus genes de virulência *tdh* e *trh* para as amostras de água e sedimento dos quatro estuários analisados, no Estado do Ceará.

Origem	Amostra	Fatores de virulência					n
		genotipos			fenotipos		
		<i>tl</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	Kanagawa	Urease	
Choró	Água	+	+	+	-	-	1
		+	+	-	+	-	6
		+	+	+	+	-	1
		+	-	-	+	-	1
	Sedimento	+	+	+	+	-	2
		+	+	-	+	-	7
		+	-	-	+	-	2
		+	+	+	-	-	1
		-	+	-	-	+	1*
Jaguaribe	Água	+	-	-	+	-	1
		+	+	+	+	-	2
		+	+	-	-	-	1
		+	+	-	+	-	5
	Sedimento	+	+	+	+	-	2
		+	-	-	+	-	2
		+	+	+	-	-	1
		+	+	-	+	-	7
Pacoti	Água	+	+	-	+	-	1
		+	+	+	+	-	3
		+	-	-	+	-	2
	Sedimento	+	+	-	+	-	6
		+	+	+	+	-	2
Pirangi	Água	+	+	+	-	-	1
		+	-	-	+	-	1
		+	+	-	+	-	1
	Sedimento	+	+	+	+	-	3
		+	+	-	+	-	1

PAA = Pacoti-água, PAS= Pacoti -sedimento, PIA= Pirangi- água, PIS= Pirangi -sedimento, CA = Choró -água, CS = Choró -sedimento, JA = Jaguaribe -água, JS = Jaguaribe -sedimento.

\* cepa confirmada como não pertencente a espécie *Vibrio parahaemolyticus*.

**TABELA 11:** Número de cepas identificadas como *V. parahaemolyticus* por tipo de amostra com a presença dos genes de identificação de espécie, da toxina e do fenômeno de Kanagawa.

Amostras (n°)	genes				Kanagawa	
	<i>tl</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tdh+trh</i>	+	-
Água	27	25	8	8	24	3
Sedimento	36	36	12	12	34	3
Total	63	61	20	20	58	6

A elevada positividade das cepas analisadas para o gene *tl*, indicador da espécie *V. parahaemolyticus*, confirma a chave de Nogueroles e Blanch (2008), uma complementação da chave de Alsina e Blanch (1994 a,b), como um esquema efetivo para a identificação das espécies de *Vibrio*. Esses dados corroboram com trabalho realizado por Croci *et al.* (2007) que ao fazerem uma comparação entre a chave de identificação para *Vibrio* de Alsina e Blanch (1994 a,b) e os kits API 20E e API 20NE, mostraram que os testes bioquímicos utilizados pelos esquemas de Alsina e Blanch (1994 a,b) foram mais eficientes para a identificação de cepas ambientais de *Vibrio*, do que os dois kits comerciais utilizados.

Gopal *et al.* (2005) ao analisarem amostras de água, sedimento e camarões da Costa da Índia, conseguiram que apenas dois isolados revelassem positividade para o gene *tdh* e um isolado para o gene *trh*, também apresentando positividade para urease.

Chao *et al.* (2009) ressaltam que a ação patogênica do *V. parahaemolyticus* é dependente da produção da hemolisina direta termoestável (TDH) e da hemolisina termoestável relacionada (TRH), codificadas pelos genes *tdh* e *trh*, respectivamente, e evidenciada pela hemólise total no meio Agar Wagatsuma, conhecido como fenômeno de Kanagawa-positivo.

Essas afirmações corroboram com os resultados obtidos para o teste de Kanagawa. Das 54 cepas positivas para *tdh*, 41 (64%) foram positivas para o fenômeno de Kanagawa. Outrossim, Devi, Surendran e Chakraborty (2009) e Rodrigues *et al.* (1993) afirmam que *V. parahaemolyticus* é o único vibrião que apresenta uma correlação entre sua patogenicidade e a beta hemólise de eritrócitos humanos no Agar Wagatsuma, Fenômeno de Kanagawa.

Em contrapartida, Ottaviani *et al.* (2010) e Hongping *et al.* (2011) ressaltam que os genes de virulência, *tdh* e *trh*, são difíceis de serem isolados de amostras ambientais e que

apenas 0,3 a 3% dos isolados ambientais não patogênicos são Kanagawa positivo. Essa positividade ocorre por conta da existência de um gene regulador denominado *toxR*, que está presente nas cepas positivas para o fenômeno de Kanagawa (GOPAL *et al.*, 2005)

Neste estudo somente uma cepa não foi confirmada, geneticamente, como pertencente à espécie *V. parahaemolyticus*, entretanto essa mesma cepa apresentou positividade para urease e para o gene *tdh*. De acordo com Hongping *et al.* (2011) ao realizarem trabalho com amostras clínicas e ambientais de *Vibrio*, 10 amostras foram positivas para a urease. Os autores ressaltam que a presença de amostras positivas para a reação de urease está relacionada com a presença do gene *trh*, fato reforçado por Gopal *et al.*, (2005) que afirmam a existência de uma correlação entre essa reação e a presença do gene *trh*.

Contudo, Masini *et al.* (2007) demonstraram em trabalho realizado com amostras ambientais em um balneário na Itália, que a produção de urease e o fenômeno de Kanagawa são correlacionados com a presença do gene *trh* e a expressão da toxina TDH em *V. parahaemolyticus*, o mesmo não acontecendo com outras espécies de *Vibrio*.

Os genes *tdh* e *trh* são conhecidos por fazerem parte do DNA de cepas pandêmicas conhecidas por serem capazes de espalhá-los no ambiente (OTTAVIANI *et al.*, 2010). No presente estudo os isolados ambientais dos quatro estuários analisados apresentaram uma frequência elevada dos genes, por essa razão, vale ressaltar que as cepas que possuem esses genes são um perigo potencial à saúde pública.

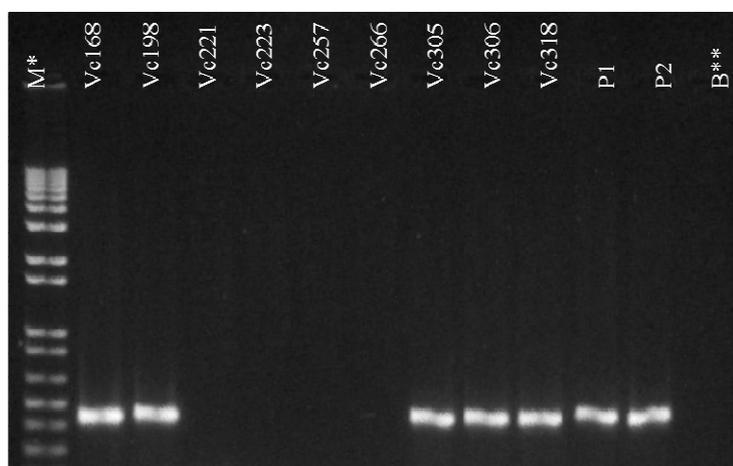
Diante do exposto, vale ressaltar que *V. parahaemolyticus* tem sido reportado como um agente causador de gastroenterites e infecções podendo em alguns casos causar septicemia. O consumo de alimentos marinhos contaminados faz com que eles sejam implicados como a maior fonte de surtos alimentares (DEVI; SURENDRAN; CHAKRABORTY, 2009).

### **5.6.2 Detecção de *V. cholerae* em água e sedimento por PCR e multiplex PCR**

*Vibrio cholerae* tem sido caracterizado como uma bactéria que faz parte da microbiota de animais que habitam a costa, os rios e as águas estuarinas em diferentes áreas do mundo (FRAGA *et al.*, 2007)

Na figura 12 se observa o perfil eletroforético das reações de PCR e de multiplex PCR das nove cepas classificadas genotipicamente como *Vibrio cholerae*. As cepas P1 e P2

são, respectivamente, padrão O1 Clássico 569B e, não O1 IOC 15.177. Apenas cinco cepas foram confirmadas como *V. cholerae*.



\*M: marcador; \*\*B: Controle negativo (Branco).

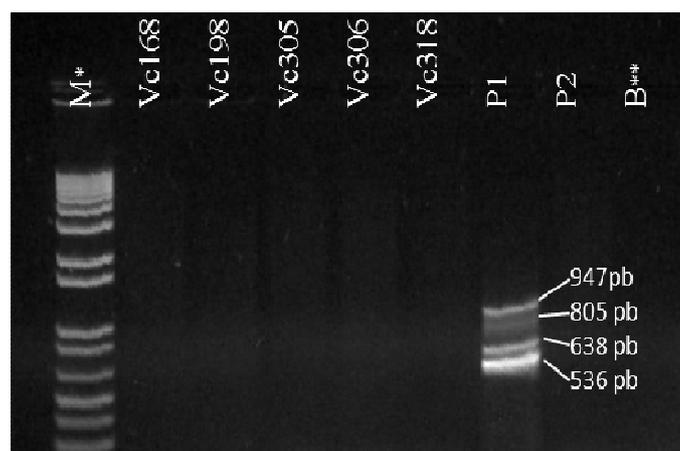
**Figura 12** – Perfil eletroforético da Polymerase Chain Reaction (PCR) de nove cepas classificadas genotipicamente como *Vibrio cholerae* com os primers detectores do gene *OmpW* (304 pb) utilizado para detectar espécie. As cepas P1 e P2 são, respectivamente, padrão O1 Clássico 569B e não O1 IOC 15.177.

O fato de quatro cepas, das nove analisadas, não terem sido confirmadas genotipicamente pode ter sido um erro na identificação fenotípica, em etapa preliminar, uma vez que, de acordo com Sharma e Chaturvedi (2006) a identificação da espécie realizada pelo gene *ompW*, mostra uma especificidade de 100% para *V. cholerae*.

Segundo Goel *et al.* (2010, 2007) o gene *OmpW* é específico para espécies de *V. cholerae*, agindo como um controle interno da espécie e sua presença confirma a identificação bioquímica dos isolados suspeitos.

A figura 13 mostra o perfil eletroforético do PCR das cepas identificadas como *Vibrio cholerae* com os primers dos genes de virulência: *ctxAB* (536 pb), *tcp* (805 pb), *rfbO1* (638 pb), e *zot* (947 pb). As cepas P1 e P2 são respectivamente O1 Clássico 569B e não O1 IOC 15.177. Nenhuma cepa estudada apresentou genes de virulência.

Essa ausência dos genes pela técnica de PCR é compatível com os resultados encontrados em estudo de cepas ambientais de *Vibrio cholerae* não-O1 isolado do zooplâncton da Baía de São Marcos/São Luis – MA, Brasil (GONÇALVES; LEAL; HOFER, 2004), no qual não foi detectado os genes de toxigenicidade *ctxA*, *zot* ou *ace* entre os 31 isolados.



\*M: marcador; \*\*B: Controle negativo (Branco).

**Figura 13** – Perfil eletroforético do PCR das cepas identificadas como *Vibrio cholerae* (Vc) com os primers dos genes de virulência: *ctxAB* (536 pb), *tcp* (805 pb), *rfbO1* (638 pb), e *zot* (947 pb). As cepas P1 e P2 são, respectivamente, O1 Clássico 569B e não O1 IOC 15.177.

Leal *et al.* (2008b) analisando bases aquáticas localizadas no Estado de Pernambuco, Brasil, observaram que cepas de *V. cholerae* não-O1 e não-O139 não apresentaram os genes *ctxA*, *zot* e *ace*. Somente uma amostra foi positiva para o gene *tcpA*. Diferentemente, Theophilo *et al.* (2006) verificando a distribuição dos marcadores de virulência em cepas clínicas e ambientais de *V. cholerae* não-O1 e não-O139 isolados no Brasil de 1991 a 2000, encontraram o gene *ctx* em uma de duas amostras ambientais analisadas, enquanto os genes *zot*, *ace* e *tcp* foram detectados nas amostras ambientais e nas clínicas. Rivera *et al.* (2001) também analisando isolados clínicos e ambientais de *V. cholerae* O1, não-O1 e não-O139, coletados no Brasil, Peru, Chile e México, obtiveram cepas positivas para os genes *ctxA* e *tcpI*, e negativas para *zot*.

Outrossim, Cariri *et al.* (2010) estudando isolados de *V. cholerae* potencialmente virulentos e não virulentos, detectou em sorogrupo O26 a presença de genes de virulência derivados do fago CTX $\phi$ , que normalmente é encontrado em associação com cepas patogênicas, com isso os autores reforçam a hipótese de que esses genes podem ter sido adquiridos através de transferência horizontal.

Por outro lado, Goel *et al.* (2007) pesquisando amostras ambientais observaram que em 56 amostras de água coletadas de diferentes pontos na Índia, nove continham o gene *rfbO1*, indicando que essas amostras pertenciam ao sorogrupo O1.

Segundo Dryselius, Kurokawa e Iida (2007) todas as espécies pertencentes ao gênero *Vibrio* possuem dois cromossomos, *V. cholerae*, particularmente, apresenta um

cromossomo maior com 2.96Mb e outro menor com 1.07Mb (HEIDELBERG *et al.*, 2000, RASMUSSEN; JENSEN; SKOVGAARD, 2007). O maior cromossomo (I) contém a maioria dos genes necessários para o crescimento e patogenicidade enquanto alguns componentes metabólicos essenciais e rotas regulatórias estão presentes no cromossomo menor (II) (SCHOOLNIK; YILDIZ, 2000). A duplicidade dos elementos genéticos pode gerar resultados falsos em estudo de detecção de genes baseado na extração de DNA. É importante o conhecimento da localização (em qual cromossomo) dos genes-alvo a fim de evitar resultado falso negativo através da otimização de protocolos de extração e amplificação.

Em contrapartida, Singh *et al.* (2001) afirmam que isolados de *V. cholerae* ambientais não apresentam a toxina TCP, responsável por um dos fatores de patogenicidade de cepas toxigênicas pertencentes ao sorogrupo O1 e O139. Concordando com as afirmações acima, Reen e Boyd (2005) reforçam que a presença dos genes *ctx* e *tcp* são predominantemente isolados de sorogrupos O1 e O139.

Noriega-Orozco *et al.* (2007) afirmam que alguns estudos genotípicos têm mostrado que *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus* não expressam seus fatores de virulência nos ambientes naturais.

Das cinco cepas identificadas como *V. cholerae*, três foram isoladas das águas dos estuários dos rios Pacoti, Choró e Jaguaribe ratificando as afirmações de Leal *et al.* (2008b) de que os componentes específicos de bases aquáticas atuam como reservatório para o vibrião colérico, em razão dessa bactéria formar associação com detritos orgânicos particulados e com a flora e a fauna aquática.

Apesar das cepas de *V. cholerae* não-O1 e não-O139 isoladas das amostras de água e sedimento dos quatro estuários analisados não terem apresentado os genes de virulência, existem evidências de que *V. cholerae* não-O1 e não-O139, mesmo não contendo, em seus DNAs, os genes de virulência são capazes de causar diarreias semelhantes a cólera (JAGADEESHAN *et al.*, 2009). Além disso, existe a possibilidade de que novas cepas de *V. cholerae* com potencial emergente possam vir a surgir no futuro (CARIRI *et al.*, 2010, RIVERA *et al.*, 2001), recebendo genes de virulência através de transferências laterais ou horizontais, mediadas por transposon, ilhas de patogenicidade e outros elementos genéticos móveis, fornecidos por outros patógenos bacterianos (LEAL *et al.*, 2008b, Theophilo *et al.*, 2006). Fato já observado em ambientes marinhos, com espécies de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* (MASINI *et al.*, 2007), podendo se tornar em um potencial risco à saúde pública.

## CONCLUSÕES

Baseado nas análises realizadas nos quatro estuários localizados no Estado do Ceará foi possível constatar que:

1. As quantidades de coliformes totais e termotolerantes não influenciaram na comunidade de *Vibrio* existente nos quatro rios analisados.
2. A temperatura e a salinidade foram os parâmetros ambientais que mais influenciaram no isolamento das cepas pertencentes às diferentes espécies de *Vibrio*.
3. Foram identificadas 19 espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, evidenciando que os estuários dos rios analisados apresentam um elevado número de espécies identificadas. As espécies mais recorrentes foram: *V. parahaemolyticus* (67) e *V. alginolyticus* (33).
4. O antibiograma das cepas isoladas mostrou uma elevada resistência à penicilina (83,2%) e à ampicilina (50,7%).
5. Foram encontradas elevadas positivities para os potenciais fatores de virulência nas cepas pertencentes às espécies de *Vibrio* patogênicas a humanos.
6. As cepas (98%) de *V. parahaemolyticus* caracterizadas fenotipicamente por chave de identificação foram confirmadas por testes moleculares e confirmaram a confiabilidade da chave descrita por Nogueroles e Blanch (2008).
7. Todos os isolados de *V. cholerae* foram negativos para os sorogrupos O1 e O139 e desprovidos dos genes de virulência.

## REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, T. D.; HOEGH-GULDBERG, O. Cellular processes of bleaching in the Mediterranean coral *Oculina patagonica*. **Coral Reefs**, Berlin, v. 27, p. 593-597, 2008.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 100, p. 1103-1113, 2006.
- ALCAIDE, E.; BLASCO, M. D.; ESTEVE, C. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 71, n. 6, p. 3348-3350, June 2005.
- ALSINA, M.; BLANCH, A. R. Improvement and update of set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, n.77, p.719-721, 1994a.
- ALSINA, M.; BLANCH, A. R. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, n.76, p.79-85, 1994b.
- AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 140, p. 310-317, 2010.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.; SUTHERLAND, R.; THOMPSON, F.; SWINGS, J. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. **Environ. Microbiol.**, Oxford, v. 7, n.9, p. 1488-1495, 2005.
- ARAÚJO, M. R. E.; AQUINO, C.; SEARAMAL, E.; CIOLA, C. S.; SCHETTINO, G.; MACHADO, M. C. C. *Vibrio vulnificus* infection in São Paulo, Brazil: case report and literature review. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 11, n. 2, p. 302-305, 2007.
- ARAÚJO, D. B.; MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B.; HOFER, E. Influence of the copepod *Mesocyclops longisetus* (Crustacea: Cyclopidae) on the survival of *Vibrio cholerae* O1 in fresh water. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 551-554, out/dez, 1996.
- ARBOLEDA, M.; REICHARDT, W. Epizoic communities of prokaryotes on healthy and diseased scleractinian corals in Lingayen Gulf, Philippines. **Microb. Ecol.**, New York, v. 57, p. 117-128, 2009.

AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. Goiânia. UFG. 1998.

BAFFONE, W.; CITTERIO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; CAMPANA, R.; FALZANO, L.; DONELLI, G. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. **Int. J. Food microbiol.**, Amsterdam v. 89, p.,31-39., 2003.

BAM – **Bacteriological Analytical Manual of the Division of Microbiology**. Center for food safety and applied nutrition. 6<sup>th</sup> Edition, U.S. Food and Drug Administration, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 232p., 1984.

BANERJEE, S.; DEVARAJA, T. N.; SHARIFF, M.; YUSOFF, F. M. Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. In controlling pathogenic bacteria from shrimp and artemia. **J. Fish Dis.**, Oxford, v. 30, p. 383-389, 2007.

BAUER, A. W.; KIRBY, M. M.; SHERRIN, J. D. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.45, p.493-496, 1966.

BAYA, A. M.; BRAYTON, P. R.; BROWN, V. L.; GRIMES, D. J.; RUSSEK-COHEN, E.; COLWELL, R. R. Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 51, n. 6, p. 1285-1292, June, 1986

BEJ, A. K.; PATTERSON, D. P.; BASHER, C. W.; VICKERY, M. C. L.; JONES, D. D.; KAYSNER, C. A. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. **J. Microbiol. Methods**, Netherlands, v. 36, p. 215-225, 1999.

BEM-HAIM, Y.; ZICHERMAN-KEREN, M.; ROSENBERG, E. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, n. 7, p. 4236-4242, 2003.

BENEDUCE, L.; VERNILE, A.; SPANO, G.; MASSA, S.; LAMACCHIA, F.; OLIVER, J. D. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in mussel farms from the Varano lagoon environment. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 51, p. 443-449, 2010.

BHANUMATHI, R.; SABEENA, F.; ISAC, S. R.; RADHAKUTTY, G.; SINGH, D. V. Characterization of a Toxigenic *Vibrio cholerae* O139 strain belonging to a new ribotype and isolated from a diarrheal patient. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, n. 12, p. 4779-4781, 2002.

BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. (eds.), **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th edition. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 964p., 1974.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environ. Microbiol.**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CARIRI, F. A. M. O.; COSTA, A. P. R.; MELO, C. C.; THEOPHILO, G. N. D.; HOFER, E.; MELO NETO, O. P.; LEAL, N. C. Characterization of potentially virulent non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains isolated from human patients. **Clin., Microbiol., Infect.**, Paris, v. 16, p. 62-67, 2010.

CAVALLO; R. A.; STABILLI, L. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). **Water Res.**, New York, v. 36, p. 3719-3726, 2002.

CAMERON, W. M.; PRITCHARD, D. W. – 1963 – Estuaries. In: Hill, M.N. (ed) **The Sea. Ideas and Observations on Progress in the Study of the Seas**. New York. Intersci. pp. 306-324.

CAMPOS, L. C. *Vibrio cholerae*. In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. editors. **Microbiologia**, 4 ed. Atheneu, São Paulo, cap. 45, p.337-343, 2004.

CAMPOS, L. C.; ZAHNER, V.; AVELAR, K. E. S.; ALVES, R. M.; PEREIRA, D. S. G.; VITAL BRAZIL, J. M.; FREITAS, F. S.; SALLES, C. A.; KARAOLIS, D. K.R. Genetic diversity and antibiotic resistnace of clinical and environmental *Vibrio cholerae* suggests that many serogroups are reservoirs of resistance. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 32, p. 985-992, 2004.

CANNICCI, S.; BARTOLINI, F.; DAHDOUH-GUEBAS, F.; FRATINI, S.; LITULO, C.; MACIA, A.; MRABU, E. J.; PENHA-LOPES, G.; PAULA, J. Effects of urban wastewater on crab and mollusc assemblages in equatorial and subtropical mangroves of East Africa. **Estuar. Coast. Shelf Sci.**, London, v. 84, p. 305–317, 2009.

CARVALHO, E. M. R. **Quantificação e identificação de *Vibrio* spp. na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) cultivados em fazendas no Estado do Ceará**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

CHAN, M.; GIM CHEONG, T.; KURUNATHAN, S.; CHANDRIKA, M.; LEDON, T.; FANDO, R.; LALITHA, P.; ZAINUDDIN, Z. F.; RAVICHANDRAN, M. Construction and

characterization of na auxotrophic *ctxA* mutant of O139 *Vibrio cholerae*. **Microb. Pathog.**, London, v. 49, p. 211-216, 2010.

CHAO, G.; JIAO, X.; ZHOU, X.; YANG, Z.; HUANG, J.; ZHOU, L.; QIAN, X. Distribution, prevalence, molecular typing, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources in coastal province Jiangsu, China. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 907-912, 2009.

CHARI, P. V. B.; DUBEY, S. K. Rapid na specific detection of luminous and non-luminous *Vibrio harveyi* isolates by PCR amplification. **Curr. Sci.**, Bangalore, v. 90, n. 8, p. 1105-1108, April, 2006.

CHEN, S. Y.; JANE, W. N.; CHEN, Y. S.; WONG, H. C. Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 129, p. 157-165, 2009.

CLSI - **CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE**. Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; approved Guideline. M49-A, Vol. 26, n° 24, 50p., 2010

COLAÇO, W.; SILVA FILHO, S. V.; RODRIGUES, D. P.; HOFER, E. *Vibrio cholerae* O<sub>1</sub> em amostras de ambientes aquáticos e de alimentos analisados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Públ**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 465-471, jul/set., 1998.

CONAMA, Brasil. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução CONAMA n. 357, 18 de março de 2005.

COSTA, R. A.; SILVA, G. C.; PEIXOTO, J. R. O.; VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F. Quantification and distribution of *Vibrio* species in water from na estuary in Ceará-Brazil impacted by shrimp farming. **Braz. J. Oceanogr.**, São Paulo, v. 58, n. 3, p. 183-188, 2010.

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, G. C.; VIEIRA, R. H. S. F.; SAKER-SAMPAIO, S. Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008a.

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, G. C.; PEIXOTO, J. R. O.; VIEIRA, R. H. S. F.; SAKER-SAMPAIO, S. *Vibrio* microfauna associated with different development stages of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.**, Bangladesh, v. 29, n. 1; 2, p. 49-51, jan./ dez., 2008b.

COSTA, M. M.; PEIXOTO, R. M.; BOIJINK, C. L.; CATAGNA, L.; MEURER, F.; VARGAS, A. C. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesq. Vet. Bras.* Rio de Janeiro, v. 28, n. 10, p. 477-480, out., 2008c.

CROCI, L.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; TOTI, L.; OTTAVIANI, D.; PRUZZO, C.; SERRATORE, P.; FISCHETTI, R.; GOFFREDO, E.; LOFFREDO, G.; MIONI, R. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v. 102, p. 229-237, 2007.

DANG, H.; REN, J.; SONG, L.; SUN, S.; AN, L. Dominant chloramphenicol-resistant bacteria and resistance genes in coastal marine Waters of Jiaozhou Bay, China. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Oxford, v. 24, p. 209-217, 2008.

DANG, H.; ZHANG, X.; SONG, L.; CHANG, Y.; YANG, G. Molecular characterizations of oxytetracycline resistant bacteria and their resistance genes from mariculture Waters of China. *Mar. Pollut. Bull.*, Oxford, v. 52, p. 1494-1503, 2006.

DAS, B.; KHAN, Y. S.; DAS, P. Environmental impact of aquaculture-sedimentation and nutrient loadings from shrimp culture of the southeast coastal region of the Bay of Bengal. *J. Environ. Sci.*, China, v. 16, n. 3, p. 466-470, 2004.

DEFOIRDT, T.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from *in vivo* work. *The ISME J.*, Geneva, v. 2, p. 19-26, 2008.

DEFOIRDT, T.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnol.*, Amsterdam, v. 25, n. 10, p. 472-479, August 2007.

DEVI, R.; SURENDRAN, P. K.; CHAKRABORTY, K. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp farms along the southwest coast of India. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Oxford, v. 25, p. 2005-2012, 2009.

DRYSELIUS, R.; KUROKAWA, K.; IIDA, T. *Vibrionaceae*, a versatile bacterial family with evolutionarily conserved variability. *Research Microbiol.*, Paris, v. 158, p. 479-486, 2007.

DSMZ. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen** GmbH [citado 15 de Jan. 2011]. Disponível em: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.html>

DUAN; J.; SU, Y.G. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in Two Oregon-growing Bays. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 70, n. 1, nov., 2005.

EILER, A.; JOHANSSON, M.; BERTILSSON, S. Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and Boreal Coastal Waters (Baltic and Skagerrak Seas). **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 72, n. 9, p. 6004-6011, 2006.

ELLISON, A. M. Mangrove restoration: Do we know enough? **Restorat. Ecol.**, Washington, v. 8, n. 3, p. 219 – 229, september 2000.

FARUQUE, S. M.; ASADULGHANI, S. M. N.; ABDUL ALIM, A. R. M.; ALBERT, M. J.; ISLAM, K. M. N.; MEKALANOS, J. J. Analysis of clinical and environmental strains of nontoxicogenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTX $\Phi$ : molecular basis for origination of new strains with epidemic potential. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5819-5825, Dec., 1998.

FENG, P.; WEAGANT, S. D., GRANT, M. A Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. In: U.S. Food and Drugs Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual online**. FDA/CFSAN. Chapter 4. sept 2002. Fortaleza, 08 de Marc. 2011. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM064948#authors>. Acesso em 08 de Marc. de 2011.

FIELD, C. **Journeys amongst mangroves**. International Society for Mangrove Ecosystems, Okinawa, Japan. South China Printing Co., Hong Kong, 140 pp., 1995.

FILIZOLA, L. R. S.; FIGUEIRÔA, A. C. T. A.; ARAÚJO, M. C. M. D.; CAVALCANTI, V. O.; LIMA, C. M.; HOFER, E. Significância de anticorpos vibriocidas circulantes em área pós-epidêmica de diarreia, São Bento do Uma, Estado de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio De Janeiro, v. 40, n. 6, p. 686-689, nov-dez, 2007.

FRAGA, S. G.; PICHEL, M.; COSTAGLIOLA, M.; CECILIA, M.; JURQUIZA, V.; PERESSUTTI, S.; CAFFER, M. I.; AULET, O.; HOZBOR, C.; TRACANNA, B. C.; GAMUDI, A. V.; HERNANDEZ, D.; RAMIREZ, F. C.; AKSELMAN, R.; BINSZTEIN, N. Environment and virulence factors of *Vibrio cholerae* strains isolated in Argentina. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 103, p. 2448-2456, 2007.

GIRAUD, E.; DOUET, D. G.; BRIS, H. L.; BOUJU-ALBERT, A.; DONNAY-MORENO, C.; THORIN, C.; POULIQUEN, H. Survey of antibiotic resistance in an integrated marine aquaculture system under oxolinic acid treatment. **FEMS Microbiol Ecol.**, Amsterdam, v. 55, p.439-448, 2006.

GOEL, A. K.; JAIN, M.; KUMAR, P.; JIANG, S.C. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* outbreak strains with altered El Tor biotype from southern India. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 26, p. 281-287, 2010.

GOEL, A. K.; JIANG, S.C. Genetic determinants of virulence, antibiogram and altered biotype among the *Vibrio cholerae* O1 isolates from different cholera outbreaks in India. *Infection, Genetics Evolut.*, Montpellier, v. 10, n. 6, p. 814-818, Aug. 2010.

GOEL, A. K.; PONMARIAPPAN, S.; KAMBOL, D. V.; SINGH, L. Single multiplex polymerase chain reaction for environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and Non-O1 *Vibrio cholerae*. **Folia Microbiol.**, Praha, v. 52, n. 1, p. 81-85, 2007.

GONÇALVES, E. G. R.; LEAL, N. C.; HOFER, E. Estudo Molecular de *Vibrio cholerae* não-O1 isolado de zooplâncton da Baía de São Marcos/São Luis – MA, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio De Janeiro, v. 37, n. 4, p. 324-328, Jul.- Ago. 2004.

GOPAL, S.; OTTA, S. K.; KUMAR, S.; KARUNASAGAR, I.; NISHIBUCHI, M.; KARUNASAGAR, I. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments, implications for food safety. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 102, , p. 151-159, 2005.

GRISI; T. C. S. L.; GORLACH-LIRA, K. The abundance of some pathogenic bacteria in mangrove habitats of Paraíba do Norte Estuary and crabmeat contamination of mangrove crab *Ucides cordatus*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v. 53, n. 1, p.227-234, jan/feb, 2010.

GROHMANN, E.; MUTH, G.; ESPINOSA, M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, New York, v. 67, n. 2, p. 277-301, june, 2003.

HAN, F.; WALKER, R. D.; JANES, M. E.; PRINYAWIWATKUL, W.; GE, B. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Glf and retail raw oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, n. 21, p. 7096-7098, Nov. 2007.

HARRIAGUE, A. C.; DI BRINO, M.; ZAMPINI, M.; ALBERTELLI, G.; PRUZZO, C.; MISIC, C. Vibrios in association with sedimentary crustaceans in three beaches of the northern Adriatic Sea (Italy). **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 56, p. 574 – 579, 2008.

HEIDELBERG, J. F. J. A.; EISEN, W. C.; NELSON, R. A.; CLAYTON, M. L.; GWINN, R. J.; DODSON, D. H.; HAFT, E. K.; HICKEY, J. D.; PETERSON, L.; UMayAM, S. R.; GILL, K. E.; NELSON, T. D.; READ, H.; TETTELIN, D.; RICHARDSON, M. D.; ERMOLAEVA, J.; VAMATHEVAN, S.; BASS, H.; QIN, I.; DRAGOI, P.; SELLERS, L.;

MCDONALD, T.; UTTERBACK, R. D.; FLEISHMANN, W. C.; NIERMAN, O.; WHITE, S. L.; SALZBERG, H. O.; SMITH, R. R.; COLWELL, J. J.; MEKALANOS, J. C.; VENTER, A.; FRASER, C. M. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. **Nature**, London, v. 406, p. 477-484, 2000.

HERNANDO, M. D.; DE VETTORI, S.; MARTINEZ-BUENO, M. J.; FENANDEZ-ALBA, A. R. Toxicity evaluation with *Vibrio fisheri* test of organic chemicals used in aquaculture. **Chemosphere**, Oxford, v. 68, p. 724-730, 2007.

HOFER, E.; REIS E. M. F.; QUINTAES, B. R.; RODRIGUES, D. P.; FEITOSA, I. S.; ANGELO, M. R. F.; RIBEIRO, L. H. F. F. *Vibrio cholerae* resistant to 2,4-diamino-6, 7-diisopropylpteridine (O/129) isolated from patients with enteritis in Ceará, Brazil. **J. Helath Popul. Nutr.**, Dhaka, v. 19, n. 1, p. 39-42, mar., 2001.

HOFER, E.; QUINTAES, B. R.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P.; SEKI, L. M.; FEITOSA, I. S.; RIBEIRO, L. H. F. F.; FERREIRA, M. R. Emergência da múltipla resistência a antimicrobianos em *Vibrio cholerae* isolados de pacientes com gastroenterite no Ceará, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 32, n.2, p. 151-156, mai/abr., 1999.

HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 174-175, jul/set., 1983.

HONGPING, W.; JILUN, Z.; TING, J.; YIXI, B.; XIAOMING, Z. Insufficiency of the kanagawa hemolytic test for detecting pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Shanghai, China. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 69, p. 7-11, 2011.

HUQ, A.; SACK, R. B.; NIZAM, A.; LONGINI, I. M.; NAIR, G. B.; ALI, A.; MORRIS Jr., J. G.; KHAN, M. N. H.; SIDDIQUE, A. K.; YUNUS, M.; ALBERT, M. J.; SACK, D. A.; COLWELL, R. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4645-4654, aug., 2005.

IGBINOSA, E. O.; OKOH, A. I. Emerging *Vibrio* species: na unending threat to public health in developing countries. **Research Microbiol.**, Paris, v. 159, p. 495 – 506, 2008.

ISLAM, M. S.; TALUKDER, K. A.; KHAN, N. H.; MAHMUD, Z. H.; RAHMAN, M. Z.; NAIR, G. B.; SIDDIQUE, A. K. M.; YUNUS, M., SACK, D. A.; SACK, R. B.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Variation of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Bangladesh and its correlation with the clinical strains. **Microbiol. Immunol.**, Japan, v. 48, n. 10, p. 773-777, 2004.

JAGADEESHAN, S.; KUMAR, P.; ABRAHAM, W. P.; THOMAS, S. Multiresistant *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 from waters in South India: resistance patterns and virulence-associated gene profiles. **J. Basic Microbiol.**, Berlin, v. 49, n. 6, p. 538–544, Oct. 2009.

JAYAPRAKASH, N. S.; KUMAR, V. J. R.; PHILIP, R.; SINGH, I. S. B. Vibrios associated with *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) larvae from three hatcheries on the Indian southwest coast. **Aquac. Res.**, Oxford, v. 37, p. 351-358, 2006.

JAYASREE, L.; JANAKIRAM, P.; MADHAVI, R. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). **J. World Aquac. Soc.**, Baton Rouge, v. 37, n.4, p. 523-532, Dec., 2006.

JOELSSON, A.; LIU, Z.; ZHU, J. Genetic and phenotypic diversity of quorum-sensing systems in clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 74, n. 2, p. 1141-1147, Feb., 2006.

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, A. *Vibrio*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, **Bacteriological Analytical Manual on line**. Chapter 9. May 2004. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>>. Acesso em 18 de agosto. de 2010.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecologic. Indicators**, Kiel, v.8, p. 1-13, 2008

KIM, Y.; CHOI, K.; JUNG, J.; PARK, S.; KIM, P.G.; PARK, J. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, imetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. **Environ. Int.**, New York, v. 33, p. 370–375, 2007.

KIRN, T. J.; TAYLOR, R. K. TcpF is a soluble colonization factor and protective antigen secreted by El Tor and Classical O1 and O139 *Vibrio cholerae* serogroups. **Infect. Immun.**, Washington, v. 73, n.8, p. 4461-4470, Aug., 2005.

KUMAR, P.; JAIN, M.; GOEL, A. K.; BHADOURIA, S.; SHARMA, S. K.; KAMBOJ, D. V.; SINGH, L.; RAMAMURTHY, T.; NAIR, G. B. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 58, p. 234-238, 2009.

KUMAR, P. A.; PATTERSON, J.; KARPAGAM, P. Multiple antibiotic resistance profiles of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139. **Jpn. J. Infect. Dis.**, Tokyo, v. 62, p. 230-232, 2009.

KRISHNA, B.V.S.; PATIL, A. B.; CHANDRASEKHAR, M.R. Fluoroquinolone-resistant *Vibrio cholerae* isolated during a cholera outbreak in India. **Transact. Royal Societ. Tropic. Medic. Hygien.**, London, v. 100, p. 224-226, 2006.

LACERDA, L. D. Biogeoquímica de contaminantes no antropoceno. **Oecol. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 297-301, 2007.

LACERDA, L. D.; ITTEKKOT, V.; PATCHINEELAM, S. R. Biogeochemistry of Mangrove soil organic matter: a comparison between *Rhizophora* and *Avicennia* soils in south-eastern Brasil. **Estuar. Coast. Shelf Sci.**, London, v. 40, p. 713-720, 1995.

LAFISCA, A.; PEREIRA, C. S.; GIACONE, V.; RODRIGUES, D. P. Enzymatic characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from bivalves harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 199-202, july-august, 2008.

LARSSON, D.G. J.; PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **J. Hazard. Mater.**, Amsterdam, v. 148, p. 751-755, 2007.

LEAL, N. C.; SILVA, S. C.; CAVALCANTI, V. O.; FIGUEIROA, A. C. T. A.; NUNES, V. V. F.; MIRALLES, I. S.; HOFER, E. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 105, p. 691-697, 2008a.

LEAL, N. C.; FIGUEIROA, A. C. T. A.; CAVALCANTI, V. O.; SILVA, S. C.; LEAL-BALBINO, T. C.; ALMEIDA, A. M. P.; HOFER, E. Characterization of *Vibrio cholerae* isolated from the aquatic basins of the State of Pernambuco, Brazil. **Transact. Royal Societ. Tropic. Medic. Hygien.**, London, v.102, p. 272-276, 2008b.

LI, H.; CHEN, G. Genetic variation within the endangered mangrov species *Sonneratia paracaseolaris* (Sonneratiaceae) in China detected by inter-simple sequence repeats analysis. **Biochem. Syst. Ecol.**, Oxford, v. 37, p. 260-265, 2009.

LIU, P. C.; LEE, K. K.; CHEN, S. N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in Tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 22, p. 413-416, 1996.

MAGALHÃES, T. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; FAÇANHA, S. H. F.; HOFER, E.; MARTIN, A. M. Note. Growth of *Vibrio parahaemolyticus* in lobster homogenates at different temperatures. **Food Sci. Tech. Int.**, London, v. 6, n. 2, p. 145-150, 2000.

MAGALHÃES, V.; CASTELLO FILHO, A.; MAGALHÃES, M.; GOMES, T. T. Laboratory evaluation on pathogenic potentialities of *Vibrio furnissii*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 4, p. 593-597, oct. /dez., 1993.

MAHMUD, Z. H.; NEOGI, S. B.; KASSU, A.; WADA, T.; ISLAM, M. S.; NAIR, G. B.; OTA, F. Seaweeds as a reservoir for diverse *Vibrio parahaemolyticus* populations in Japan. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 118, p. 92-96, 2007.

MANNING, P. A.; STROHER, U. H.; KARAGEORGOS, L. E.; MORONA, R. Putative O-antigen transport genes within the *rfb* region of *Vibrio cholerae* O1 are homologous to those for capsule transport. **Gene**. Beckenham, v. 1, n. 1, p. 1-7, Jun. 1995.

MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Instrução Normativa**, Brasília, n 9, de 27 de junho de 2003.

MARINS, R. V.; PAULA FILHO, F. J.; ROCHA, C. A. S. Geoquímica de fósforo como indicadora da qualidade ambiental e dos processos estuarinos do Rio Jaguaribe – costa nordeste oriental brasileira. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1208-1214, 2007.

MARTINEZ-URTAZA, J.; LOZANO-LEON, A.; DePAOLA, A.; ISHIBASHI, M.; SHIMADA, K.; NISHIBUCHI, M.; LIEBANA, E. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 42, n. 10, p. 4672-4678, Oct., 2004

MASINI, L.; DE GRANDIS, G.; PRINCIPI, F.; MENGARELLI, C.; OTTAVIANI, D. Research and characterization of pathogenic vibrios from bathing water along the Conero Riviera (Central Italy). **Water Res.**, New York, v. 41, p. 4031-4040, 2007.

MENDES, E. S.; LIRA, S. F.; GÓES, L. M. N. B.; DOURADO, J.; MENDES, P. P.; ALVES, C. A. B. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo e fazenda marinha em Pernambuco. **Cienc. Anim. Bras.**, Goiania, v. 10, n. 4, p. 1191-1199, out./dez., 2009.

MENDES, E. S.; MENDES, P. P.; GÓES, L. M. N. B.; BEZERRA, S. S.; VIEIRA, K. P. B. A. Os víbrios na carcinicultura. **Panor. Aquic.**, Rio De Janeiro, p. 26-29, set.-out., 2005.

MENDES, E. S.; ALVES, C. A. B.; BEZERRA, S. S.; MENDES, P. P.; SANTOS, F. L. Sensibilidade in vitro à enrofloxacin e oxitetraciclina de *Vibrio* isolados na larvicultura de

camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*). **Ciênc. Vet. Trop.**, Recife, v. 7, ns. 2 e 3, p.90-97, mai./dez., 2004.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antimicrobial multiresistance in bactéria isolated from freshwater Chilean salmon farms. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v. 293, p. 207-218, 2002.

MIZUNO, T.; SULTAN, S. Z.; KANEKO, Y.; YOSHIMURA, T.; MAEHARA, Y.; NAKAO, H.; TSUCHIYA, T.; SHINODA, S.; MIYOSHI, S. I. Modulation of *Vibrio mimicus* hemolysin through limited proteolysis by an endogenous metalloprotease. **FEBS J.**, Oxford, v. 276, p. 825–834, 2009.

MOLINA –AJA, A.; GARCIA-GASCA, A.; ABREU-GROBOIS, A.; MEJÍA-BOLÁN, C.; ROQUE, A.; GOMEZ-GIL, B. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam v. 213, p. 7-12, 2002.

MONTES, M.; FARTO, R.; PÉREZ, M. J.; ARMADA, S. P.; NIETO, T. P. Genotypic diversity of *Vibrio* isolates associated with turbot (*Scophthalmus maximus*) culture. **Research Microbiol.**, Paris, v. 157, p. 487-495, 2006.

MUDRYK, Z. J. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 50, p. 80-86, 2005.

NANDI, B.; NANDY, R.; MUKHOPADHYAY, S.; NAIR, G. B.; SHIMADA, T.; GHOSE, A.C. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 11, p. 4145-4151, Nov., 2000.

NAYLOR, R. L.; GOLDBURG, R. J.; MOONEY, H.; BEVERIDGE, M.; CLAY, J.; FOLKE, C.; KAUTSKY, N.; LUBCHENCO, J.; PRIMAVERA, J.; WILLIAMS, M. Nature's subsidies to shrimp and salmon farming. **Science**, Cambridge, v. 282, p. 883-884, 1998.

NOGUEROLA, I.; BLANCH, A. R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, n. 105, p.175–185, 2008.

NONAKA, L.; IKENO, K.; SUZUKI, S. Distribution of tetracycline resistance gene, *tet* (M), in Gram-positive and Gram-negative bactéria isolated from sediment and seawater at a coastal aquaculture site in Japan. **Microbes Environ.**, Tokyo, v. 22, n. 4, p. 355-364, 2007.

NORIEGA-OROZCO, L.; ACEDO-FÉLIX, E.; HIGUERA-CIAPARA, I.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; CANO, T. Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. **Rev. Latinoam. Microbiol**, México, v. 49, n. 3-4, p. 60-67, july - december, 2007.

OKUDA, J., KANAMURU, S., YUASA, A., NAKAOKA, N., KAWAKAMI, H., NAKAI, T. A possible mechanism of quinolona resistence in *Vibrio anguillarum*. **Fish Pathology**, Tokyo, v.41, n. 2, p. 73 -75, Jun, 2006.

OKUDA, J.; NISHIBUCHI, M. Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene. **Molecular Microbiol.**, Salem, Mass., v. 30., n. 3. P. 499-511, 1998.

OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; ABBOTT, S. L.; JANDA, J. M.; NISHIBUCHI, M. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, n. 8, p. 1965-1971, Aug., 1997.

OTTAVIANI, D.; LEONI, F.; ROCCHIGIANI, E.; CANÔNICO, C.; POTENZIANI, S.; SANTARELLI, S.; MASINI, L.; SCUOTA, S.; CARRATURO, A. *Vibrio parahaemolyticus*-associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1:KUT serotype. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 66, p. 452-455, 2010.

PANIGRAHI, A.; AZAD, I. S. Microbial intervention of better fish health in aquaculture: the India scenario. **Fish Physiol. Biochem.**, Dordrecht v. 33, p. 429-440, 2007.

PARK, K.S.; IIDA, T.; YAMAICHI, Y.; OYAGI, T.; YAMAMOTO, K.; HONDA, T. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 68, n. 10, p. 5742-5748, Oct., 2000.

PARVEEN, S.; HETTIARACHCHIL, K. A.; BOWERS, J. C.; JONES, J. L.; TAMPLIN, M. L.; MCKAY, R.; BEATTY, W.; BROHAWN, K.; DASILVA, L.V.; DEPAOLA, A. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 128, p. 354-361, 2008.

PAUL, J. H.; FRISCHER, M. E.; THURMOND, J. M. Gene de transfer in marine water column and sediment microcosms by natural plasmid transformation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1509-1515, May, 1991.

PAZZANI, C.; SCRASCIA, M.; DIONISI, A. M.; MAIMONE, F.; LUZZI, I. Molecular epidemiology and origino f cholerae reemergence in Italy and Albania in the 1990s. **Research Microbiol.**, Paris, v. 157, p. 508-512, 2006.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp.isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de estação experimental de cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 387 – 390, 2007.

PFEFFER, C. S.; HITE, F. M.; OLIVER, J. D. Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of eastern North Carolina. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, p. 3526-3531, 2003.

POIREL, L.; LIARD, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M.; NORDMANN, P. *Vibrionaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 56, p. 1118–1121, 2005.

PONTES, D. S.; PINHEIRO, F. A.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; GUEDES, R. L. M.; CURSINO, L.; BARBOSA, F.; SANTOS, F. R.; CHARTONE-SEOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Multiple antimicrobial resistance of Gram-negative bactéria from nataral oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. **Environ. Microbiol.**, Oxford, v. 58, p. 762-772, 2009.

**PRENSA LATINA, AGÊNCIA INFORMATIVA LATINOAMERICANA.** Haiti registra 4.030 mortos por cólera. Fortaleza, 02 de fev. 2011.  
Disponível em : [http://www.prensa-latina.cu/index.php?option=com\\_content&task=view&id=259199&Itemid=1](http://www.prensa-latina.cu/index.php?option=com_content&task=view&id=259199&Itemid=1). Acesso em 02 de fev. 2011.

RAHAMN, S.; KHAN, S. N.; NASER, M. N.; KARIM, M. M. Isolation of *Vibrio* spp. From penaeid shrimp hatcheries and coastal waters of Cox's Bazar, Bangladesh. **Asian J. Exp. Biol. Sci.**, Bangladesh, v. 1, n. 2, p. 288-293, 2010.

RAHMAN, M.; BHUIYAN, N. A.; KUHN, I.; RAMAMURTHY, T.; RAHMAN, M.; MOLLBY, R.; NAIR, G. B. Short Report. Biochemical fingerprinting of *Vibrio parahaemolyticus* by the PhenePlate system: comparison between pandemic and non-pandemic serotypes. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 134, p. 985-989, 2006.

RASMUSSEN, T.; JENSEN, R. B.; SKOVGAARD, O. The two chromosomes of *Vibrio cholerae* are initiated at different time points in the cell cycle. **Embo J.**, Oxford, v. 26, n. 13, p. 3124–3131, 2007.

RANDRIANARIVELO, R.; DANTHU, P.; BENOIT, C.; RUEZ, P.; RAHERIMANDIMBY, M. SARTER, S. Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: effects of the essential oil of *Cinnamosma fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 109, p. 642–650, 2010.

REBOUÇAS, R. A. **Monitamento da microbiota bacteriana da água em um sistema fechado de cultivo em uma estação de piscicultura marinha.** 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

REBOUÇAS, R. H.; SOUSA, O. V.; LIMA, A. S.; VASCONCELOS, F. R.; CARVALHO, P. B.; VIEIRA, R. H. S. F. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. **Environ. Res.**, San Diego, v. 111, n. 1, p. 21-24, jan., 2011.

REEN, F. J.; BOYD, E. F. Molecular typing of epidemic and nonepidemic *Vibrio cholerae* isolates and differentiation of *V. cholerae* and *V. mimicus* isolates by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 98, p. 544-555, 2005.

RIVERA, I. N. G.; CHUN, J., HUQ, A.; SACK, R. B.; COLWELL, R. R. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2421-2429, june, 2001.

ROBERT-PILLOT, A.; GUÉNOLÉ, A.; LESNE, J.; DELESMONT, R.; FOURNIER, J. M.; QUILICI, M.L. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from Waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 91, p. 319-325, 2004.

RIZVI, A. V.; PANICKER, G.; MYERS, M. L.; BEJ, A. K. Detection of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 serovar in Gulf of Mexico water and shellfish using real-time PCR with Taqman® fluorescent probes. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 262, p. 185-192, 2006.

RODRIGUES, S. M. A.; GINÇALVES, E. G. R.; MELLO, D. M.; OLIVEIRA, E. G.; HOFER, E. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de raposa-MA. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio De Janeiro, RJ, v. 34, n.5, p. 407-411, set./out., 2001.

RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO, R. V.; ALVES, R. M.; HOFER, E. Evaluation of virulence factors in environmental isolates of vibrio species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 4, p. 589-592, oct./dec., 1993.

SCHOONILK, G. K.; YILDIZ, F. H. The complete genome sequence of *Vibrio cholerae*: a tale of two chromosomes and of two lifestyles. **Genome Biol.**, Ottawa, v. 1, n. 3, p. 1016.1–1016.3, 2000.

SHARMA, A.; CHATURVEDI, A. N. Prevalence of virulence genes (*ctxA*, *stn*, *OmpW* and *tcpA*) among non-O1 *Vibrio cholerae* isolated from fresh water environment. **Int. J. Hyg. Environ. Health**. Jena, v. 209, n° 6, p. 521-526, Nov. 2006.

SHAKHNOVICH, E.A.; STURTEVANT, D.; MEKALANOS, J. Molecular mechanisms of virastatin resistance by non-O1/non-O139 strains of *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, Salem, Mass., v. 66, n. 6, p. 1331-1341, 2007.

SINGH, D. V.; MATTE, M. H.; MATTE, G. R.; JIANG, S.; SABEENA, F.; SHUKLA, B. N.; SANYAL, S. C.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, n. 2, p. 910-921, Feb., 2001.

SMITH, P. Antimicrobial use in shrimp farming in Ecuador and emerging multi-resistance during the cholera epidemic of 1991: A re-examination of the data. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 271, p. 1-7, 2007.

SOBRINHO, P. S. C.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Correlation between environmental factors and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters harvested in the southern coastal area of São Paulo State, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 76, n. 4, p. 1290-1293, feb., 2010.

SOUSA, O. V. **AVALIAÇÃO DO PERFIL DA COMUNIDADE MICROBIANA DE ECOSISTEMAS DE MANGUEZAL RECEPTORES DE EFLUENTES DA ATIVIDADE DE CULTIVO DE CAMARÃO NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL.** 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SOUSA, O. V.; MACRAE, A.; MENEZES, F. G. R.; GOMES, N. C. M.; VIEIRA, R. H. S. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove Waters, Ceará, Brazil. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 52, p. 1725-1734, 2006.

SOUSA, O. V. *Vibrio parahaemolyticus*. In: Vieira, R.H.S.F (ed.), **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado – teoria e prática.** São Paulo: Varela, 2004. cap. 12, p.219-226.

SRINIVASAN, P.; RAMASAMY, P. Occurrence, distribution and antibiotic resistance patterns of *Vibrio* species associated with viral disease Shrimp of South Indian Aquaculture Environment. **Int. J. Agric.Sci.**, Columbia, USA, v. 1, n. 2, p. 01-10, 2009.

SUGITA, H.; ITO, Y. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 43, p. 336-342, 2006.

SUNG, H. H.; HSU, S. F.; CHEN, C. K.; TING, Y. Y.; CHAO, W. L. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 192, p. 101-110, 2001.

TAKAHASHI, A.; MIYOSHI, S. I.; TAKATA, N.; NAKANO, M.; HAMAMOTO, A.; MAWATARI, K.; HARADA, N.; SHINODA, S.; NAKAYA, Y. Haemolysin produced by *Vibrio mimicus* activates two Cl<sup>-</sup> secretory pathways in cultured intestinal-like Caco-2 cells. **Cell. Microbiol.**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 583-595, 2007.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S.; LU, C. Y.; BERRY, R. Mapping and characterization of mangrove plant communities in Hong Kong. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 352, p. 25-37, 1997.

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. Edição revista e atualizada, Editora Ateneu, São Paulo, 585p., 2007.

THEOPHILO, G. N. D.; RODRIGUES, D. P.; LEAL, N. C.; HOFER, E. Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 2, p.65-70, March-April, 2006.

THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; VICENTE., A. C. P. Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA) **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, Inglaterra, v. 58, p. 617-621, 2008.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of *Vibrios*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, New York, v. 69, n. 3, p. 403-431, set., 2004.

URREGO, L. E.; BERNAL, G.; POLANÍA, J. Comparison of pollen distribution patterns in surface sediments of a Colombian Caribbean mangrove with geomorphology and vegetation. **Review Palaeob. Palynol.**, Amsterdam, v. 156, p. 358-375, 2009.

VIEIRA, C. B.; VIEIRA, R. H. S. F.; SOUSA, O. V. *Vibrio* spp. em hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* coletados em três fazendas de cultivo do Estado do Ceará. **Bol. tec.-cient. CEPNOR**, Belém, v. 9, p. 141-149, 2009.

VIEIRA, R. H. S. F.; LIMA, A. S.; MENEZES, F. G. R.; Costa, R. A.; SOUSA, O. V.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S. Vibrioses em camarão cultivado. **Arq. Cienc. Mar.**, Fortaleza, v.42, p.112 - 120, 2009.

VITAL, M.; FUCHSLIN, H. P.; HAMMES, F.; EGLI, T. Growth of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa Eltor in freshwater. **Microbiol.**, Reading, v. 153, p. 1993-2001, 2007.

WAGATSUMA, S. A medium for the test of the hemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus*. **Media Circle**, v. 13, p. 159, 1968.

WALTON, M. E.; VAY, L. L.; LEBATA, J. H.; BINAS, J.; PRIMAVERA, J. H. Assessment of the effectiveness of mangrove rehabilitation using exploited and non-exploited indicator species. **Biol. Conserv.**, Essex, v. 138, p. 180-188, 2007.

WARD, L. N.; BEJ, A. K. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan Fluorescent Probes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 72, n. 3, p. 2031-2042, Mar., 2006.

WATKINS, W. D.; CABELLI, V. J. Effect of fecal pollution on *Vibrio parahaemolyticus* densities in an estuarine environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 49, n. 5, p. 1307-1313, may, 1985.

WORSNIP, P. Epidemia de cólera no Haiti se dissemina rapidamente, diz ONU. **O Globo** Fortaleza, 23 nov. 2010.

Disponível: <http://oglobo.globo.com/mundo/mat/2010/11/23/epidemia-de-colera-no-haiti-se-dissemina-rapidamente-diz-onu-923093869.asp>. Acesso em: 23 nov. 2010

YANG, Z. Q.; JIAO, X. A.; ZHOU, X. H.; CAO, G. X.; FANG, W. M.; GU, R. X. Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 125, p. 279-285, 2008.

YATES, C. M.; PEARCE, M. C.; WOLHOUSE, M. E. J.; AMYES, S. G. B. High frequency transfer and horizontal spread of apramycin resistance in calf faecal *Escherichia coli*. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 54, p. 534-537, 2004.