

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Isolamento e Identificação de Bactérias Potencialmente Patogênicas
a partir de Bivalves no Arquipélago de Santana – Macaé, RJ.**

Marcelo Santos de Oliva

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS A PARTIR DE
BIVALVES NO ARQUIPÉLAGO DE SANTANA – MACAÉ, RJ.**

MARCELO SANTOS DE OLIVA

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

Dissertação submetida
como requisito parcial
para obtenção do grau
de Mestre em
Microbiologia
Veterinária.

Seropédica, RJ

Outubro de 2008

589.9

048i

T

Oliva, Marcelo Santos de, 1970-
Isolamento e identificação de
bactérias potencialmente
patogênicas a partir de bivalves no
Arquipélago de Santana - Macaé, RJ
/ Marcelo Santos de Oliva - 2008.
49f. : il.

Orientador: Miliane Moreira
Soares de Souza.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Microbiologia Veterinária.

Bibliografia: f. 30-43.

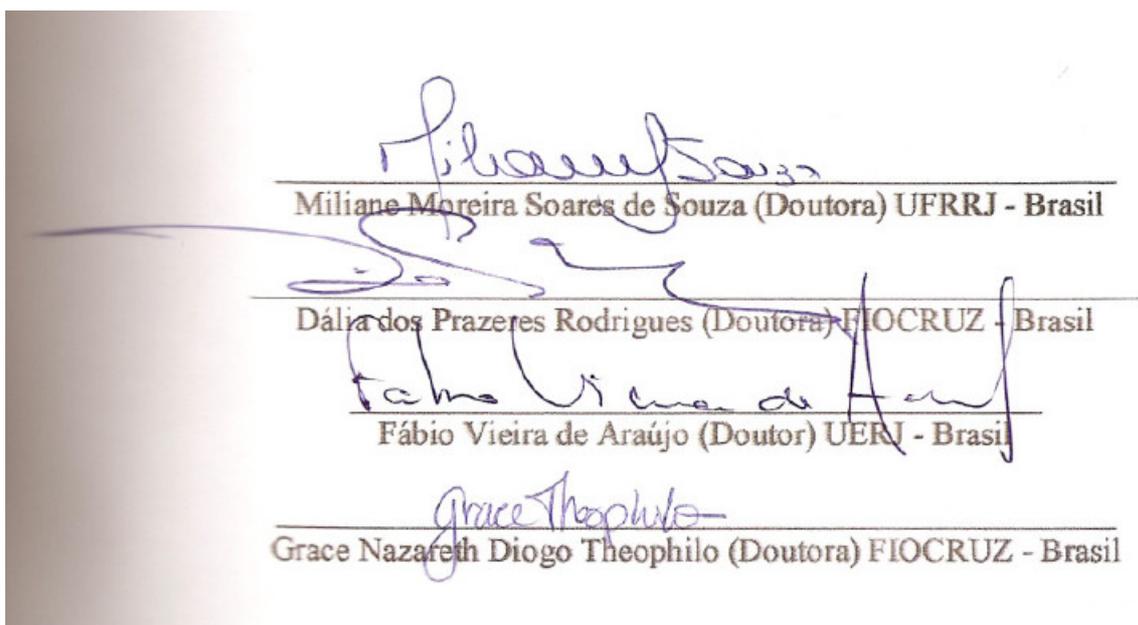
1. Bactéria - Identificação -
Macaé (RJ) - Teses. 2. Bivalve
(Molusco) - Teses. 3. Mexilhão -
Teses. I. Oliva, Marcelo Santos de,
1970-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Microbiologia
Veterinária. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

MARCELO SANTOS DE OLIVA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, em 13 de novembro de 2008.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13/11/08.



Miliane Moreira Soares de Souza (Doutora) UFRRJ - Brasil

Dália dos Prazeres Rodrigues (Doutora) FIOCRUZ - Brasil

Fábio Vieira de Araújo (Doutor) UERJ - Brasil

Grace Nazareth Diogo Theophilo (Doutora) FIOCRUZ - Brasil

**“Os sonhos são como bússola,
indicando os caminhos que
seguiremos e as metas que
queremos alcançar. São eles
que nos impulsionam, nos
fortalecem e nos permite
crescer.”**

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar no mundo, a quem atribuo toda minha força, sabedoria e vida. Obrigado por me proteger e conduzir por caminhos seguros. Eu te amo meu Deus.

A minha família, aos meus pais por serem meu porto seguro, a razão da minha vida. Todos os dias agradeço a Deus por ter pais maravilhosos. Tenho honra de tê-los com meus pais. Eles são exemplos de dedicação, honestidade e de amor. Agradeço a eles por tudo o que sou. Obrigado pelo incentivo, força e compreensão. Amo os senhores.

Aos meus irmãos pelo amor de vocês, o companheirismo, incentivo e dedicação nos momentos difíceis da minha vida. Amo vocês.

A amiga Shana de Mattos de Oliveira Coelho, pelo alto astral, amizade, ajuda, incentivo. Obrigado pelas palavras de otimismo que foram fundamentais ao meu crescimento profissional.

A amiga Ingrid Annes Pereira pela paciência, dedicação, sagacidade e que sempre esteve pronta a ajudar e esclarecer minhas dúvidas. Agradeço imensamente sua colaboração ao meu aprendizado e desenvolvimento.

Ao amigo Bruno Castro Gomes pela sua amizade e alegria que leva ao Laboratório, sendo um exemplo de dedicação e compromisso em tudo que realiza. Muito obrigado por ser um grande amigo.

Ao amigo Bruno Rocha Pribul por sua contribuição ao desenvolvimento desta dissertação, por sua dedicação, ajuda e compromisso com as coletas. Pelo seu empenho em coletar os mexilhões em situações de difícil acesso.

A todos os amigos do Laboratório de Bacteriologia que me auxiliaram no desenvolvimento da minha dissertação e a todos que passaram pelo laboratório.

Ao amigo Gilberto. Pela paciência, ajuda e apoio ao desenvolvimento desta dissertação.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação que contribuíram com suas idéias e incentivos ao desenvolvimento da minha dissertação e em especial, ao Professor Francisco de Assis Baroni por suas palavras de sabedoria.

A todos meus amigos do Curso de Pós-Graduação por momentos inesquecíveis, e em especial a Landreani Ramires e Bruno Berto.

A amiga Cleia Maria Monteiro da Cunha por suas palavras de apoio e incentivo. Obrigado por ter sido um cupido em minha vida. Eu te agradeço por tudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Empresa Serviços Marítimos Continental S.A. e em especial ao Srº Afonso, Miro e Celso pelo apoio logístico e estrutural para realização das coletas. Sem esta contribuição seria difícil a realização desta pesquisa .

Ao Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo apoio financeiro e logístico para realização da pesquisa realizada. Sem sua contribuição esta pesquisa não teria sido realizada com sucesso.

Ao Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz e em especial a Drª Dália dos Prazeres Rodrigues, Drª *Grace* Nazareth Diogo *Theophilo* e a Técnica Simone Duarte Amorim pela oportunidade e treinamento realizado, o qual foi de suma importância para realização do trabalho realizado e para o meu crescimento profissional e pessoal.

A minha orientadora Miliane Moreira Soares de Souza pela oportunidade, credibilidade, confiança e pela contribuição em meu crescimento profissional e pessoal, onde encontrei sempre palavras de apoio, conforto e incentivo. Obrigado por tudo o que você fez e faz em minha vida. Obrigado por ter acreditado em mim e ter proporcionado esta experiência inesquecível, por ter aberto novos horizontes. Agradeço a você a chance de ter conhecido pessoas maravilhosas que fizeram uma grande transformação em minha vida profissional e pessoal.

Ao amigo Carlos Velasco por sua amizade de tantos anos. Você foi um dos responsáveis por eu chegar até aqui, por causa do seu convite em fazer o curso de mergulho eu conheci pessoas que me abriram portas para que eu pudesse realizar esta meta em minha vida. Obrigado por sua contribuição nas coletas. Agradeço a Deus por ter você mais do que um amigo e sim um grande irmão.

Ao amigo Marco Antonio Soares de Souza por ter sido a pessoa responsável pela realização desta etapa da minha vida. Quando estávamos embarcados conversamos sobre a possibilidade de realizar um curso de Pós-Graduação. Obrigado por ter acreditado em mim e ter proporcionado esta experiência inesquecível. Tenho um grande orgulho de ser seu amigo. Obrigado por sua contribuição no desenvolvimento desta dissertação, na elaboração e na coordenação dos mergulhos realizados para coleta das amostras, pois foram indispensáveis para o sucesso das coletas.

Ao amigo Gerson de Lima por sua amizade, dedicação, palavras de força e otimismo nos momentos difíceis e sua contribuição para desenvolvimento do trabalho realizado.

Ao meu amigo Fernando Brazil pelo apoio, orientação e ajuda nos momentos difíceis da minha vida, onde sempre teve e tem palavras de força e apoio. Um amigo que considero como um grande irmão. Obrigado pela sua amizade.

E, finalmente, a pessoa que sempre me incentivou, ajudou com suas idéias fabulosas e sua sagacidade, que contribuiu de forma espetacular para execução da minha dissertação. Aturou meu mau humor sem reclamar, foi paciente, e nos momentos difíceis sempre disse palavras de

carinho, conforto, apontando saídas, dando conselhos sábios e que puxou minha orelha nos momentos necessários. Esta pessoa sem sobra de dúvida somente Deus poderia colocar no meu caminho, Lidiane de Castro Soares, o meu eterno amor. Obrigado por tudo que você fez e faz em minha vida. Só tenho que agradecer a Deus por ter colocado você em minha vida.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 01 | Arquipélago de Santana – Ilhote Sul | 46 |
| Figura 02 | Mexilhão <i>Perna perna</i> | 46 |
| Figura 03 | Agar TCBS | 47 |
| Figura 04 | Agar GSP | 47 |
| Figura 05 | O129 | 48 |
| Figura 06 | Perfil de Suscetibilidade de <i>Vibrio</i> spp. | 48 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Gráfico 01 | Distribuição de espécies de <i>Vibrio</i> isoladas. | 22 |
| Gráfico 02 | Distribuição de enterobactérias isoladas. | 26 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 01 | Número de espécies bacterianas isoladas em cada coleta. | 21 |
| Tabela 02 | Número de espécies de <i>Vibrio</i> isoladas em cada coleta. | 22 |
| Tabela 03 | Número de espécies de enterobactérias isoladas em cada coleta. | 26 |

LISTA DE ABREVIACOES

UFC: Unidade Formadora de Colnia
VNC: Viável Mas Não Cultivvel
TDH: Thermoestable Direct Hemolysin
TRH: Thermoestable Related Hemolysin
°C : Graus Centígrados
S: Sul
W: Oeste
m: metro
Km: kilmetro
mL: mililitro
TCBS: gar Tiosulfato Citrato Sais Biliares Sacarose
GSP: Seletivo para Pseudomonas-Aeromonas
LIA: Lysine Iron *Agar*
VP : Voges-Proskauer
VM : Vermelho de Metila
MC: Mac Conkey
EMB: *Eosin* Methylene-blue Agar
APA: gua Peptonada Alcalina
SS: *Salmonella Shigella*
TSI: Triple Sugar Iron
MVF: Manitol Vermelho de Fenol
SPS: Sulfito Polimixina Sulfadiazina
TPGY: Trypticase peptone-glucose-yeast extract
MH: Müeller Hinton
LST: Lauryl Sulfato Triptose
NMP: Número Mais Provável
EC: *Escherichia coli*
L: Litro
TSA: Agar Trypticase de Soja

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 01 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 02 |
| 2.1 Biologia dos Mexilhões | 02 |
| 2.2 Importância Sócio-Econômica | 03 |
| 2.3 Qualidade Microbiológica dos Mexilhões | 04 |
| 2.4 Gênero <i>Vibrio</i> | 05 |
| 2.4.1 <i>Vibrio cholerae</i> | 06 |
| 2.4.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 07 |
| 2.4.3 <i>Vibrio vulnificus</i> | 08 |
| 2.4.4 <i>Vibrio alginolyticus</i> | 10 |
| 2.4.5 Outras espécies de <i>Vibrio</i> | 10 |
| 2.5 Gênero <i>Aeromonas</i> | 11 |
| 2.6 Enterobactérias | 12 |
| 2.7 Resistência Antimicrobiana | 13 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1. Ponto de Coleta | 15 |
| 3.2 Análise Microbiológica da Água do Mar | 15 |
| 3.2.1 Amostragem | 15 |
| 3.2.2 Processamento das amostras | 15 |
| 3.2.2.1 Pesquisa de Coliformes Totais e Termotolerantes | 15 |
| 3.3 Análise Microbiológica dos Mexilhões | 16 |
| 3.3.1 Amostragem | 16 |
| 3.3.2 Processamento das amostras | 16 |
| 3.4 Pesquisa de microrganismos com potencial patogênico | 16 |
| 3.4.1 Pesquisa de <i>Vibrio</i> spp. e <i>Aeromonas</i> spp. | 16 |
| 3.4.1.1 Identificação fenotípica dos isolados | 17 |
| 3.4.1.2 Fermentação de açúcares | 17 |
| 3.4.1.3 Descarboxilação de lisina e ornitina e dehidrolização de arginina | 17 |
| 3.4.1.4 Avaliação da halofilia | 17 |
| 3.4.1.5 Sensibilidade ao O/129 | 17 |
| 3.4.1.6 ONPG | 18 |
| 3.4.1.7 Prova de motilidade e produção de indol | 18 |
| 3.4.1.8 Prova de Voges-Proskauer (VP) e Vermelho de Metila (VM) | 18 |
| 3.4.1.9 Redução de nitrato | 18 |
| 3.4.2 Pesquisa de Enterobactérias | 19 |
| 3.4.2.1 Comportamento em ágar TSI | 19 |
| 3.4.2.2 Hidrólise de gelatina | 19 |
| 3.4.2.3 Produção de uréase | 19 |
| 3.4.2.4 Degradação do citrato | 19 |
| 3.4.2.5 Degradação do malonato | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5. Perfil de Suscetibilidade dos Microrganismos Isolados aos Fármacos de Eleição | 20 |
| 3.5.1 Inóculo | 20 |
| 3.5.2 Difusão em disco | 20 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 4.1. Análise Microbiológica do Mexilhão | 21 |
| 4.1.1 Pesquisa de <i>Vibrio</i> spp. | 21 |
| 4.1.1.1 Perfil de suscetibilidade de <i>Vibrio</i> spp. isolados de mexilhões <i>Perna perna</i> | 24 |
| 4.1.2 Pesquisa de <i>Aeromonas</i> spp. | 25 |
| 4.1.3 Pesquisa de Enterobactérias | 26 |
| 4.1.3.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> | 27 |
| 4.1.3.2 Perfil de suscetibilidade de Enterobactérias isolados de mexilhões <i>Perna perna</i> | 28 |
| 4.2 Pesquisa de Coliformes Totais e Termotolerantes da Água do Mar | 28 |
| 5 CONCLUSÕES | 29 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 30 |
| 7 ANEXOS | 45 |

RESUMO

OLIVA, Marcelo dos Santos. **Isolamento e Identificação de Bactérias Potencialmente Patogênicas a partir de Bivalves no Arquipélago de Santana – Macaé, RJ.** 2008. 48p Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Os mexilhões são moluscos bivalves filtradores que se alimentam de microrganismos captados pela corrente de água e não apresentam capacidade seletiva de filtração do seu alimento, conseqüentemente, a análise dos mexilhões reflete a qualidade microbiológica do habitat aquático. Desse modo, o presente trabalho objetivou executar o isolamento e identificação da microbiota bacteriana a partir de moluscos bivalves incrustados em costões rochosos no Arquipélago de Santana, Macaé- RJ, bem como analisar o perfil de resistência dos microrganismos prevalentes. Também se buscou avaliar a qualidade da água de modo a detectar possíveis contaminações decorrentes das atividades pesqueiras e subaquáticas nesta região. A partir das análises bacteriológicas foi obtido um total de 51 colônias de *Vibrio* spp. com prevalência da espécie *V. damsela* (n=15), seguida de *V. harveyi* (n=13) e *V. alginolyticus* (n=07) e um total de 20 colônias de enterobactérias com prevalência de *Escherichia coli* (n=06) seguida de *Proteus vulgaris* (n=04). Os isolados de *Vibrio* spp. apresentaram 100% de sensibilidade aos antimicrobianos testados, com exceção da ampicilina, para a qual não foi detectada qualquer sensibilidade a semelhança de outros relatos na literatura. Nos isolados de enterobactérias avaliados, foram detectados elevados percentuais de sensibilidade aos antimicrobianos testados. No total de seis amostras de água do mar analisadas, não foi detectada a presença de coliformes totais e termotolerantes. O baixo percentual de microrganismos isolados de mexilhões no Arquipélago de Santana pode ser justificado por ser um local de mar aberto, afastado da costa e sobre a influência de correntes marítimas, e ainda pouco impactado pela ação humana.

Palavras-chaves: mexilhões, saúde pública, bactérias.

ABSTRACT

OLIVA, Marcelo dos Santos. **Isolation and Identification of Potential Pathogenic Bacterial from Bivalves at Arquipélago de Santana – Macaé, RJ.** 2008. 48p Dissertation (Master Science in Veterinary Microbiology) Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Mussels are bivalve mollusks that developed a filtrating system enabling them to uptake nutrients from water. This is a not selective mechanism, so mussels microbiological analysis shows up the aquatic environment quality. Therefore, the present work aimed to isolate and identify bacterial microbiota from bivalve mollusks incrustated into the rocky coast of Arquipélago de Santana, Macaé, RJ. The antimicrobial resistance pattern of prevalent microorganisms isolated was also analyzed. The surrounding water microbiological quality was also evaluated in order to detect contamination source from fishing and subaquatic activities in the studied region. From the bacteriological analysis it was obtained a total of 51 isolates of *Vibrio* spp., being *V. damsela* (n=15) the prevalent specie, followed by *V. harveyi* (n=13) and *V. alginolyticus* (n=07). It was also obtained a total of 20 isolates of Enterobacteriaceae species, being *Escherichia coli* (n=06) the prevalent one, followed by *Proteus vulgaris* (n=04). *Vibrio* spp. isolates presented 100% of sensitivity to tested antimicrobials, except for ampicillin with no detected sensitivity corroborating to literature. For enterobacteria, it was detected a high percentile of sensitivity to all testes antimicrobials. In the six samples of ocean water analyzed it was not possible to detect total or fecal coliforms. The low percentile of isolated microorganisms from mussels at Arquipélago de Santana can be justified for its location at the open sea, far away from the coast and influenced by sea currents, in a environment not yet altered by human action.

Key words: mussels, public health, bacteria.

1 INTRODUÇÃO

Os mexilhões são moluscos bivalves filtradores que se alimentam de microrganismos captados pela corrente de água e não apresentam capacidade seletiva de filtração do seu alimento. Seu cultivo comercial é uma prática que tem crescido em todas as regiões litorâneas do Brasil devido às riquezas dos recursos naturais do ecossistema aquático. Por se alimentarem de partículas em suspensão na água podem representar importante veículo de transmissão de bactérias e vírus patogênicos, além de metais pesados e outras substâncias tóxicas.

As fontes de contaminação de mexilhões são o esgoto e resíduos industriais e os contaminantes por matéria orgânica, microrganismos, óleos, detergentes, produtos não biodegradáveis e metais pesados. Os microrganismos e metais pesados são os contaminantes mais perigosos porque nem sempre causam alterações aparentes ou imediatas e o molusco, embora contaminado, pode ser considerado apto para consumo.

A análise microbiológica dos mexilhões reflete a qualidade do seu habitat aquático e estes organismos devem ser constantemente monitorados através de análises microbiológicas e físico-químicas a fim de garantir a produção de um alimento inócuo para a saúde humana.

Os membros da família Vibrionaceae são habitantes naturais de ambientes marinhos e estuários e muitos podem causar infecções em humanos, podendo estar associados a manifestações gastrointestinais sob a forma de surtos ou casos esporádicos após à ingestão de pescado e moluscos bivalves sem cocção ou insuficientemente cozidos. A infecção por *Vibrio* spp. Também pode em alguns casos apresentar quadros clínicos de septicemia, otites, infecções de pele e tecidos moles. As infecções são, geralmente, adquiridas por consumo de alimento e água contaminada ou mais raramente, por contaminação direta de feridas cutâneas ocorrida durante o contato com a água do mar ou estuarinas.

Além do gênero *Vibrio*, a família Aeromonadaceae é um agente bacteriano amplamente distribuído no ecossistema aquático. Estes microrganismos são responsáveis por causar infecções em animais e no homem, sendo descritos como patógenos de importância em alimentos e envolvidos em infecções intestinais e extraintestinais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia dos Mexilhões

Os mexilhões são moluscos bivalves filtradores que possuem a capacidade de reter microrganismos captados pela corrente de água através do batimento dos cílios e das brânquias. Não apresentam capacidade seletiva de filtração do seu alimento, sendo a ingestão de partículas selecionada apenas pelo tamanho. O fitoplâncton e os detritos são a principal fonte de alimento para o seu crescimento. Por serem filtradores, estes moluscos se revelam adequados à utilização como bioindicadores devido à natureza sésil e sua ampla distribuição. Durante o processo fisiológico da alimentação, a água entra na cavidade palial através do sifão aspirante, passando pela brânquia da óstia e é expelida pelo sifão expirante. Ambos os sifões possuem um véu que pode regular o fluxo da corrente de água. As partículas de alimentos são presas pelo muco espalhado sobre as lamelas branquiais concentrando-se assim, nos tecidos dos moluscos (BEIRÃO et al., 2000; LIRA et al., 2001).

São invertebrados, de simetria bilateral e que essencialmente estão compostos por quatro regiões: cabeça, pé, saco visceral e manto. Os moluscos da classe bivalvia vivem exclusivamente na água, possuem concha formada por duas valvas unidas dorsalmente por um ligamento. Seu habitat natural é a região do mesolitoral de costões rochosos, podendo estender-se até o infralitoral. Vivem presos pelo bisso a substratos consolidados, tanto em locais com forte arrebentação como em pontos mais abrigados, sendo, porém mais abundantes em costões rochosos expostos à ação das ondas. Como vivem principalmente na região de entre marés, estão adaptados a permanecer por longos períodos expostos ao ar e ao sol (LIRA et al., 2001).

Quando fixos aos costões rochosos são chamados “bancos naturais” constituindo um rico ecossistema que abrange não só os mexilhões, mas também um grande número de organismos vegetais e animais que vivem a eles associados, principalmente cracas, poliquetas, anfípodes, pequenos caranguejos e gastrópodes, bem como algas verdes, pardas e vermelhas (MARQUES, 1988).

Nos locais de fixação definitiva, no médio-litoral e início do infra-litoral, os mexilhões chegam a formar densas populações nos costões rochosos marinhos, tanto em pontos de forte arrebentação como em locais mais abrigados, podendo ocorrer até a profundidade de 30 metros (FREITAS, 1997). De fato, qualquer substrato consolidado pode servir como ponto de fixação, o que permite a ocorrência de incrustações em dutos, e em cabos subaquáticos utilizados para transmissão de dados para plataformas petrolíferas.

Possuem uma taxa elevada de bombeamento de água, estimada entre 0,5 a quatro litros por hora dependendo do seu tamanho e das condições ambientais. Em todo o mundo existem classificadas mais de 20.000 espécies de moluscos bivalves, dentre estes, destaca-se o *Perna perna* (GOTTING, 1974; LINDNER, 1989) que atualmente apresentam a seguinte classificação taxonômica: Filo Mollusca; Classe Bivalvia; Ordem Mytiloidea; Família Mytilidae; Gênero *Perna* e espécie *perna* (MARQUES et al., 1998).

O gênero tropical *Perna* encontra-se distribuído pelos oceanos Atlântico (costa da América do Sul e África) e Índico (África, Ásia e Oceania) e no mar Mediterrâneo na Costa Africana. Esta espécie foi, provavelmente, introduzida no Brasil nos séculos XVI e XIX com as águas de lastro e/ou incrustações dos navios negreiros vindos da África. Hoje é abundante entre o litoral do Espírito Santo e Rio Grande do Sul (SOUZA, 2003).

A espécie *Perna perna*, anteriormente denominada *Mytilus perna*, é estritamente dióica, tendo a reprodução sexuada como padrão reprodutivo. O dimorfismo sexual em bivaleves é muito raro, normalmente reconhecido pelo exame microscópico das gônadas. No caso do *P. perna*, machos e fêmeas podem ser diferenciados, internamente, em algumas fases

do ciclo reprodutivo, quando a coloração das gônadas nos machos apresentam-se branco-leitosa e nas fêmeas vermelho-alaranjado (LUNETTA, 1969).

Os bivalves marinhos constituem estoques naturais de recursos renováveis que dependem de todo um ecossistema em equilíbrio para sua reprodução e desenvolvimento.

2.2 Importância Sócio-Econômica

No cenário nacional, a pesca está incluída entre as quatro maiores fontes de fornecimento de proteína animal para o consumo humano. Além de sua importância para a nutrição, os recursos pesqueiros requerem uso e manejo sustentável por sua importância sócio-econômica, ambiental e cultural. A sustentabilidade dos recursos pesqueiros depende de vários fatores, entre esses, da pesca, tamanho da frota, retorno econômico, a existência de políticas de subsídios e incentivos, o emprego de métodos predatórios de pesca, degradação dos habitats, várias formas de poluição marinha, doméstica, industrial e decorrente do uso de insumos agrícolas; o desmatamento e a degradação dos recursos hídricos; oscilações climáticas e oceânicas (FIPERJ, 2008).

Nos últimos anos a produção pesqueira mundial encontra-se estabilizada em torno de 100 milhões de toneladas. A maior parte dos estoques pesqueiros tradicionais encontra-se em declínio, principalmente devido à sobrepesca e a outros fatores antrópicos tais como a poluição (DULVY et al., 2003; PAULY; WATSON, 2004). Diante deste quadro, surge a idéia de que a maricultura pode constituir uma alternativa para o sustento de comunidades pesqueiras defrontadas com a atual crise na pesca (BERRE, 1995; HENRIQUES, et al., 2000).

A mitilicultura é um ramo da aquicultura responsável pelo cultivo de mexilhões que apresentam valor comercial. Pelo fato do mexilhão ser cultivado com relativa facilidade, requerendo pequeno investimento para a implantação e simplicidade de manutenção, a atividade vem crescendo em todo o mundo e tem sido reportada como excepcional alternativa de produção e renda, principalmente para pescadores artesanais (ARANA, 1999; VINATEA, 2000).

A mitilicultura desenvolvida de maneira artesanal beneficia economicamente, em sua grande maioria, famílias de pescadores artesanais e pequenas empresas de produtores. Os produtos são vendidos na sua maioria *in natura*, e quando muito, beneficiados de maneira precária pelos próprios produtores. O cultivo de mexilhões e ostras vem dinamizar a economia do Estado, beneficiando mais particularmente o pequeno produtor, que tem na atividade um meio de subsistência para sua família, uma vez que somente a pesca, por sua sazonalidade, não lhe permite uma situação financeira estável (ARANA, 1999).

No entanto, é necessária a condução de ações que orientem os produtores na gestão da produção e das demandas surgidas pelos beneficiários tais como cursos, apoio a comercialização e obtenção de crédito. A produção, na sua grande maioria, é comercializada *in natura* no mercado local, regional e somente uma pequena parte é comercializada no mercado nacional devido às limitações impostas pela distância (conservação) e pela necessidade de Sistema de Inspeção Federal (HENRIQUES, 2001).

A maricultura implantada no Estado do Rio de Janeiro vem permitindo às comunidades locais se beneficiarem desta atividade zootécnica de forma auto-sustentada em sintonia com o ecossistema costeiro. A viabilidade econômica da atividade vem proporcionando o ingresso de novos maricultores, beneficiando as gerações presentes e criando perspectivas para as gerações futuras. Estas sociedades passaram a ter um papel definitivo na determinação, planificação e execução de suas prioridades diminuindo, assim, os conflitos e compatibilizando as alternativas econômicas (FIPERJ, 2008).

Os cultivos também vêm contribuindo para a fixação das populações tradicionais em seus locais de origem, além de terem modificado substancialmente a maneira como essas populações encaram a necessidade da preservação do meio ambiente, pois a idéia de cultivar o mar impõe a necessidade de manutenção deste. Uma vez que os impactos são gerados pelo cultivo, estes serão absorvidos pelo ambiente, e a não observação da capacidade de suporte poderá levar ao declínio da produção e até mesmo a extinção da atividade (SODRÉ, 2001).

Dentro do contexto social, a participação familiar na complementação de renda se dá pelo extrativismo, com a raspagem dos mexilhões no costão rochoso realizada por mulheres e crianças, ficando o homem encarregado da pesca e da manutenção e manejo do cultivo. O beneficiamento também é realizado por mulheres e crianças, onde basicamente é retirada a concha, cozida a carne e logo em seguida embalada para a comercialização.

Um dos principais problemas ambientais relacionados ao cultivo de mexilhões está na preservação dos bancos naturais destes organismos nos costões rochosos, uma vez que as sementes retiradas dos costões rochosos não são suficientes para suprir criações comerciais e possibilitar a expansão da atividade de cultivo de mexilhões (*Perna perna*), gerando, assim, uma pressão antrópica negativa sobre os ecossistemas naturais, tornando-se necessária à instalação de coletores artificiais de sementes (MARQUES et al., 1998). A retirada das sementes do costão torna-se um problema devido o uso de pás para raspar a rocha retirando junto com os moluscos os substratos aonde novas larvas iriam se fixar. O desaparecimento dos mariscos reflete-se na fauna que se alimenta destes animais, como os poliquetas. Além disso, a intensa atividade de raspagem nas rochas prejudica o turismo por causa da poluição visual. Os marisqueiros que dependem da extração de mexilhões do costão para sobreviverem, que vêm ameaçada sua fonte de renda, também acabam se tornando um entrave na expansão da maricultura, pois eventualmente não avaliam esta atividade pela ótica do desenvolvimento sustentável e do desenvolvimento da comunidade em parceria da conservação do habitat natural. Para se contornar tal desafio, seriam necessárias ações de educação ambiental voltadas para as comunidades envolvidas com a cata e também com o cultivo do mexilhão e maior atuação do poder público no tocante a fiscalização mais efetiva, visando o combate à má exploração das sementes de mexilhão nos costões (SODRÉ, 2001).

Existem três formas de obtenção das sementes: raspagem nos costões, o uso de coletores artificiais (estruturas próximas ao cultivo para a fixação natural das larvas) e a reprodução em laboratório, que implica manejo de reprodutores, alimentação artificial e criação de larvas. Por razões econômicas e de preservação ambiental, o sistema de fixação artificial é o mais recomendável. Isto é possível em virtude do mexilhão ser uma espécie nativa, que ocorre naturalmente nas regiões costeiras.

Essa expansão tem representado novas oportunidades de trabalho, pois, embora prevaleça o envolvimento da mão-de-obra familiar, ocorre também utilização de pessoas contratadas, como constataram diferentes estudos de campo. Segundo a FAMASC (2002) em 1990 foram produzidas 190 toneladas de mexilhões sendo que em 2001 a produção alcançou 10.667 toneladas.

2.3 Qualidade Microbiológica dos Mexilhões

A qualidade dos moluscos bivalves, especialmente ostras e mexilhões, está diretamente relacionada com a qualidade dos ambientes onde são cultivados ou extraídos. Além disto, devido a sua ampla distribuição na costa marítima e estuário, os moluscos estão por inúmeras vezes sujeitos à poluição por esgoto, principalmente nas proximidades de grandes centros urbanos.

O consumo de moluscos bivalves marinhos é uma prática crescente em todas as regiões litorâneas do Brasil, devido às riquezas dos recursos naturais do ecossistema aquático. Estes moluscos são geralmente consumidos *in natura* sem prévio cozimento adicionado de algumas gotas de limão. Este fato torna-se um risco potencial para a saúde humana, pois os moluscos alimentam-se por processo de filtração, de partículas e microrganismos em suspensão na água, permitindo a retenção de bactérias, protozoários e vírus patogênicos, além de metais e outros compostos químicos tóxicos e toxinas provenientes de certos microrganismos, representando um problema de saúde pública quando oriundos de áreas poluídas ou contaminadas (RIPPEY, 1994; BEIRÃO et al., 2000). Tais características acarretam elevada perecibilidade, exigindo cuidado no manuseio e conservação, para garantir qualidade do produto *in natura* (FERREIRA; MAGALHÃES 1992).

Além de representar risco à saúde humana pela ingestão *in natura*, os mexilhões também podem ser responsáveis por lesões teciduais decorrentes de sua manipulação por indivíduos desprovidos de equipamentos de segurança (BEIRÃO et al., 2000).

A família Enterobacteriaceae tem sido utilizada como indicadora da qualidade sanitária das águas de cultivo de moluscos bivalves, sendo a contagem de microrganismos viáveis em crustáceos e moluscos, animal inteiro ou a carne separada da concha, alcançando populações ente 10^3 e 10^7 UFC/g. Além das enterobactérias, a literatura relata infecções por *Vibrio* spp. associados a ingestão ou ferimentos de moluscos bivalves. Estes microrganismos fazem parte da microbiota natural de estuários e águas marinhas, podendo se acumular nos tecidos dos bivalves durante sua alimentação (BRASIL, 2001).

2.4 Gênero *Vibrio*

O gênero *Vibrio* pertence à família Vibrionaceae onde estão agrupadas bactérias patogênicas para o homem, causando desde gastroenterites autolimitantes até quadros graves de septicemia, podendo levar os pacientes ao óbito (GERMANO; GERMANO, 2001). São microrganismos habitantes naturais de ambientes aquáticos presentes em águas salgada, salobra e doce, podendo estar presentes em moluscos bivalves e outros crustáceos (BUTT et al., 20004; GIBOTTI et al., 2000).

Possui cerca de 79 espécies sendo principalmente *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticu*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* as principais causadoras de gastroenterite no homem e em alguns casos, septicemia. No entanto, a espécie mais importante é o *V. cholerae*, uma vez que este é responsável pela cólera, uma doença endêmica e epidêmica em extensas áreas do globo terrestre (JAY, 2005).

O gênero *Vibrio* é constituído por bastonetes retos ou curvos, Gram-negativos e não esporulados. A maioria das cepas produz oxidase, com exceção de *V. metschnikovii* e *V. gazogenes*, são fermentadores de glicose sem produção gás e catalase positivos (THOMPSON et al., 2004). Possuem a capacidade de se adaptar de maneira dinâmica às mudanças ambientais como temperatura, pH, salinidade e concentrações de nutrientes, utilizando uma variedade de mecanismos genéticos e fisiológicos. Um destes mecanismos é denominado de estado viável, mas não cultivável (VNC) no qual as bactérias reduzem seu volume celular e adquirem forma cocóide. Este fenômeno representa um estado de dormência, sobrevivência e persistência no meio ambiente. Nesta situação o método convencional de cultivo em placas torna-se pouco adequado, sendo necessária a utilização de técnicas de biologia molecular para sua detecção (LLEÓ et al., 2001). *Vibrio* spp. geralmente se apresenta no estado VNC quando associada à superfície externa de crustáceos planctônicos, mas passa para o estado viável no intestino humano. Este fato, associado às mais altas concentrações de vibrios nos copépodes do que na coluna de água, faz com que a ingestão acidental destes microcrustáceos seja provavelmente responsável pela manifestação da cólera (COLWELL et al., 1996).

A ecologia dos vibrios nos sistemas aquáticos tem sido bem estudada visto que a distribuição das espécies é afetada pela salinidade, disponibilidade de nutrientes e temperatura, dentre outros parâmetros (THOMPSON et al., 2004).

Diversas espécies do gênero *Vibrio* têm sido reconhecidas como patógenos de interesse para o homem e isoladas de várias regiões costeiras de clima temperado e tropical. A capacidade desses microrganismos em causar gastroenterite humana, sob a forma de surtos ou casos esporádicos associados ao consumo de moluscos *in natura* ou insuficientemente cozidos ou condições precárias de higiene, aumenta sua importância em saúde pública (WHO, 2005).

2.4.1 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae foi descrito e nomeado por Paccini em 1854 e isolado por Robert Koch em 1884, recebendo o nome de “Kommabacillus” devido ao característico aspecto curvo das células bacterianas. É o responsável por causar epidemias e pandemias de cólera desde 1817. As cepas podem ser divididas de acordo com as diferenças na composição da parede celular (antígeno somático O) que classifica o grupo em mais de 200 sorogrupos diferentes. Todas as cepas apresentam um antígeno flagelar comum (H). Na década de 30 descobriu-se que as cepas pandêmicas eram aglutinadas por um único anti-soro, denominado O1. As cepas de *V. cholerae* O1 podem ser divididas em três sorogrupos: Inaba, Ogawa e Hikogima. A identificação desses sorogrupos possui importância para estudos epidemiológicos (COLWELL, 1996). As cepas epidêmicas do sorovar O1 podem ou não produzir toxinas e dividem-se em biovar clássico e em biovar El Tor, sendo esta última um biótipo de *V. cholerae* altamente hemolítico e o responsável pela maioria dos surtos atuais de cólera (BRAVO et. al., 1998).

Até o momento foram registradas sete pandemias de cólera na história, sendo as três últimas causadas por *V. cholerae* sorogrupo O1. A sétima pandemia iniciou-se em 1961, quando o *Vibrio cholerae*, biótipo El Tor, ultrapassou os limites de uma área endêmica em Célebes, Indonésia, e estendeu-se a outros países da Ásia Oriental. Reforçada pelos deslocamentos da população, através dos movimentos migratórios, a pandemia chegou a Bangladesh no final de 1963, à Índia em 1964, e à União Soviética, Irã e Iraque em 1965 e 1966 (NARCKEVICH et al., 1993). Em 1970, a cólera invadiu a África Ocidental e se dispersou rapidamente ao longo da costa e das vias fluviais, onde a doença é endêmica, especialmente nas zonas costeiras, onde a temperatura, pluviosidade e densidade populacional contribuem para a sua persistência (GLASS et al., 1991). Nos anos seguintes, a cólera atingiu alguns países industrializados, mas a eficiência dos serviços de saúde, do sistema de vigilância epidemiológica e, sobretudo das condições de saneamento ambiental não permitiram a sua instalação (TOLEDO, 1993).

A cólera foi introduzida na América Latina através do litoral peruano, atingindo posteriormente o Brasil e outros países da América do Sul. No decorrer de 1991, a cólera espalhou-se pelo continente americano, atingindo 14 países, com 391.734 casos confirmados e causando 4.002 óbitos; em 1992, 20 países notificaram 352.300 casos e 2.399 óbitos; em 1993, 20 países notificaram 204.547 casos e 2.362 óbitos; em 1994, 15 países notificaram 12.612 casos e 1.229 óbitos (WHO, 1994).

A introdução da cólera no Brasil ocorreu pela floresta Amazônica, no Alto Solimões, alastrando-se progressivamente pela região Norte, seguindo o curso do Rio Solimões/Amazonas e seus afluentes, principal via de deslocamento de pessoas na região, e no ano seguinte para as regiões Nordeste e Sudeste através dos principais eixos rodoviários. Atualmente o comportamento da cólera sugere um padrão endêmico, definido pela ocorrência regular de casos e flutuações cíclicas de maior ou menor gravidade, na dependência de condições locais que favoreçam a circulação do *Vibrio cholerae* (MAGALHÃES et al., 1993).

O reservatório comprovado da cólera é o homem. No entanto, a presença desse microrganismo no habitat aquático e sua associação à quitina de copépodes, zooplânctons e peixes, podem favorecer a contaminação dos moluscos bivalves durante o processo de filtração da água.

Durante a expansão da sétima pandemia de cólera na América Latina e Caribe, o consumo de ostras e pescados crus foi considerado como de alto risco de transmitir essa doença. Produtos crus que entram em contato com águas contaminadas por fezes humanas podem ser veiculadores dessa doença e de outros agentes patogênicos fecais, além da recontaminação de produtos cozidos e da própria água de consumo não tratada (WHO, 1997).

A infecção intestinal por *Vibrio cholerae* resulta na perda de grande quantidade de água através das fezes, levando a uma rápida e progressiva desidratação. A toxina colérica estimula a secreção de fluidos ricos em sódio, bicarbonato e potássio, em volumes superiores à capacidade de absorção do intestino. Estima-se que a dose infectante para causar a doença seja de aproximadamente um bilhão de células de *V. cholerae* (SACK et al., 2004).

Sorogrupos não O1 do *Vibrio cholerae* já foram identificados em todo mundo, sabendo-se que os mesmos podem ocasionar patologias extra-intestinais, diarreias com desidratação severa semelhante à cólera. O *Vibrio cholerae* O 139 foi o primeiro *Vibrio cholerae* não O1 identificado como responsável por considerável mortalidade. As enterotoxinas elaboradas são similares para o grupo e ocasionam quadros clínicos muito semelhantes. A resistência do biotipo El Tor é maior, o que lhe dá condições de sobreviver por mais tempo no meio ambiente, crescer melhor e mais rápido em meios de cultura, além de lhe conferir menor suscetibilidade aos agentes químicos e maior tendência à endemização (BLAKE, 1993).

2.4.2 *Vibrio parahaemolyticus*

O isolamento de *V. parahaemolyticus* foi feito inicialmente por Fujino em 1951, a partir de um surto de gastroenterite de origem alimentar ocasionado a partir da ingestão de “shirasu” que são sardinhas novas, semidessecadas e parcialmente cozidas. (SAKAZAKI et al., 1963; FUJINO et al., 1974). As gastroenterites por *V. parahaemolyticus* estão quase sempre associadas ao consumo de frutos do mar, particularmente de pratos ao estilo da culinária japonesa, à base de frutos do mar crus ou insuficientemente cozidos, sendo os peixes e moluscos crus os principais veiculadores desta bactéria (DANIELS et al., 2000; SOUSA et al., 2004).

V. parahaemolyticus é um habitante natural do ambiente marinho, especialmente em climas temperados, com distribuição mundial. Pode ser encontrado em água de estuários, sendo facilmente encontrado em águas costeiras, no sedimento, em partículas suspensas, plâncton e uma variedade de peixes e frutos do mar (BUTT et al., 2004).

Algumas cepas de *V. parahaemolyticus* possuem a capacidade de produzir beta hemólise em Agar Wagatsuma (meio básico acrescido de eritrócitos humanos e elevada concentração de sal - 7%). O teste foi denominado Kanagawa e está estreitamente relacionado com a enteropatogenicidade, sendo adotado como parâmetro fenotípico na identificação de cepas patogênicas e não-patogênicas. Os principais fatores, incriminados como promotores da hemólise do fenômeno de Kanagawa são as hemolisinas TDH (Thermoestable Direct Hemolysin – hemolisina termoestável direta) e TRH (Thermoestable Related Hemolysin – hemolisina termoestável relacionada) consideradas importantes fatores de virulência (PEREIRA et al., 2004a; GONZALEZ et al., 2005). No entanto, estudos recentes indicam que cepas Kanagawa negativas podem ser capazes de provocar infecção gastrentérica em humanos indicando a possibilidade de existência de mais de um fator de virulência no desencadeamento das infecções (HONDA et al., 1991; GONZALEZ et al., 2005).

Foi relatado recentemente que algumas cepas possuem a capacidade de hidrolisar uréia, sugerido uma forte associação com a presença de TRH. A presença desses fatores de virulência geralmente ocorre em cepas oriundas de achados clínicos, enquanto naquelas isoladas de ambiente ou alimentos marinhos são apontados resultados negativos ou com percentuais oscilantes de até 1% no teste de Kanagawa e hidrólise de uréia (NAKAGUCHI et al., 2003; GONZALEZ et al., 2005; HEITMANN et al., 2005).

Algumas evidências sugerem que cepas de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa-positivas isoladas de ambiente aquático podem ter como reservatório os sedimentos aquáticos e a carapaça quitinosa de moluscos e copépodes. Esta característica contribui para a distribuição e ciclo anuais da bactéria no sistema estuarino (WEST, 1989).

Os sintomas causados por infecções por *V. parahaemolyticus* surgem normalmente de 4 a 96 horas após a ingestão do alimento contaminado com um elevado número de microrganismos (100 mil a 10 milhões) e são típicos de uma gastroenterite: diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos, dores na cabeça, calafrios e algumas vezes febre (COOK et al., 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Além do seu papel na gastroenterite, *V. parahaemolyticus* é conhecido como agente causador de infecções extra-intestinais em humanos como septicemia secundária, infecções oculares, infecções do conduto auditivo e de feridas após a exposição ao ambiente marinho (JAY, 2005).

A literatura relata a presença de vários sorogrupos de *V. parahaemolyticus* responsáveis por manifestações de gastroenterite, sendo reconhecidas mais de 75 combinações de sorotipos O e K (BHUIYAN et al., 2001). Cepas pertencentes ao sorovar O3:K6 ocasionaram o primeiro episódio de pandemia por *V. parahaemolyticus* ocorrido na história, surgindo abruptamente na Índia, em 1996, tendo sido disseminadas a oito países, incluindo Japão e Estados Unidos (MATSUMOTO et al., 2000). Hayat Mahumd. (2006) alertam para o risco que o consumo de alimentos de origem marinha pode representar para a saúde pública, uma vez que cepas de *V. parahaemolyticus* toxigênicas (O3:K6) têm sido isoladas dessas fontes, apresentando potencial para provocar pandemias.

2.4.3 *Vibrio vulnificus*

De acordo com Hollis et al. (1976), *V. vulnificus* foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1964 e foi inicialmente identificado como uma cepa virulenta de *V. parahemolyticus*. Somente em 1970 este microrganismo foi reconhecido como uma nova espécie, devido o surgimento de casos de septicemia veiculada por alimentos e infecções de feridas apresentando características distintas das outras espécies de *Vibrio* (CERDA-CUÉLLAR et al., 2001).

Vibrio vulnificus é fenotipicamente similar ao *V. parahaemolyticus*, apresentando características bioquímicas semelhantes como lisina e ornitina descarboxilase positiva e arginina deidrolase negativa. A diferenciação entre estes dois microrganismos é baseada na capacidade de *V. vulnificus* fermentar a lactose, o que também o diferencia de outros membros do gênero, onde a maioria das cepas é ONPG (β -galactosidase) positivas e fermentadoras de lactose (TAMPLIN, 2001).

Vibrio vulnificus é habitante natural do ambiente marinho e sua presença não está associada à poluição ou a qualquer outra forma de contaminação (STROM; PARANJPYE, 2000). Por essa razão, a detecção e enumeração dessa bactéria no ambiente tem sido prioridade das agências responsáveis pela garantia sanitária dos produtos marinhos (HARWOOD et al., 2004).

Apresenta distribuição cosmopolita ocorrendo principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical, onde a temperatura das águas oscila entre 9 e 31°C. A proliferação

desta espécie é maior quando a temperatura da água é acima de 18° C. Em temperaturas mais baixas, menores que 10° C, estes organismos ficam em estado VNC (OLIVER; KAPER, 1997; MORENO; LANDGRAF, 1998). Dados da literatura relatam à sobrevivência de cepas de *V. vulnificus* em ostras cruas mantidas a temperatura de - 20°C. (OLIVER; KAPER, 1997; BRYAN et al., 1999; STROM; PARANJPYE, 2000).

A frequência das infecções por *V. vulnificus* é maior nos meses de verão e a variação sazonal favorece seu crescimento em ambientes aquáticos onde a temperatura é alta e a salinidade baixa (HEELAY et al., 2002).

Uma característica marcante de *V. vulnificus* é seu potencial patogênico ao homem com grande capacidade de invasão e letalidade. É responsável por 95% das mortes relacionadas ao consumo de alimentos marinhos nos Estados Unidos, sendo o consumo de moluscos bivalves *in natura* ou parcialmente cozidos a principal causa de gastroenterite (OLIVER; KAPER, 1997, COOK, 1997). No entanto, este microrganismo não tem sido incriminado como agente causal de surtos, sendo responsável por casos isolados da doença (CERDÀ-CUÉLLAR, et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2001).

As infecções de feridas podem ocorrer em indivíduos saudáveis havendo contaminação de uma lesão prévia com a bactéria, ou em lesões adquiridas em ambiente de estuário (CALIF, et al., 2002; PFEFFER, et al., 2003). Esta bactéria pode entrar no organismo através de lesões na epiderme, gerando dor intensa e edema local, podendo em alguns casos levar a amputação do membro afetado ou através da ingestão de alimentos marinhos crus ou mal cozidos, ocasionando febre, calafrios, náuseas, hipotensão, septicemia e morte em cerca de 50% dos casos (FRANCO; LANDGRAF, 2003; YANO et al., 2004). Este patógeno possui relevância na saúde de pescadores e manipuladores de mexilhões, visto que as valvas destes moluscos podem ocasionar ferimentos durante sua manipulação e os ferimentos podem ser infectados por este microrganismo, causando uma grave infecção local.

De acordo com Huss et al. (2004), *V. vulnificus* produz produtos extracelulares como hemolisina, citolisina, protease, fosfolipase e sideróforos, os quais são responsáveis pela rápida degradação do tecido muscular durante a infecção, atuando como fatores de virulência. As proteases apresentam atividades de elastase e collagenase, que podem ser responsáveis pela extensa necrose de tecido local, observadas durante as infecções de feridas. A presença da cápsula polissacarídica é essencial para provocar o processo infeccioso e confere resistência contra os efeitos bactericidas do soro e fagocitose por mocrófagos (MIYOSHI, et al., 1994; OLIVER; KAPER, 1997; MORENO; LANDGRAF, 1998). Segundo Horr é et al. (1996) a análise da composição da cápsula de cepas de *V. vulnificus* revelou a existência de mais de um tipo antigênico. Os tipos capsulares 1 e 2 estão relacionados a cepas isoladas de espécimes clínicos e os outros tipos de cápsula foram reconhecidos em amostras de água do mar e animais marinhos.

Diferentemente das demais espécies patogênicas de *Vibrio*, o *V. vulnificus* invade e se multiplica na corrente sanguínea, ocorrendo óbito em 40 a 60% dos pacientes com disfunção hepática (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003). Pacientes com síndromes que levam ao aumento de deposição de ferro como cirrose crônica, talassemia major, hepatite, hemocromatose e consumo de álcool excessivo também estão mais suscetíveis a septicemia por *V. vulnificus*.

Três diferentes biótipos de *V. vulnificus* foram identificados. Aproximadamente 85% das cepas isoladas de amostras clínicas pertencem ao biótipo 1, enquanto o biótipo 2 provoca infecções em enguias. O biótipo 3 foi identificado recentemente e está associado com bacteremia veiculada a alimentos de origem marinha. Estes biótipos foram estabelecidos baseados em características bioquímicas, como produção de indol, descarboxilação da ornitina e crescimento a 42°C. No entanto, esta classificação, originalmente estabelecida em

1982, tende a ser substituída por sorovares (STROM; PARANJPYE, 2000; CERDÀ-CUÉLLAR, et al., 2001).

Além de estar associado a infecções em humanos, Høi et al. (1998) e DePaola et al. (1997) relatam a presença deste microrganismo no intestino de peixes e na água do mar.

2.4.4 *Vibrio alginolyticus*

Vibrio alginolyticus é uma bactéria presente no ambiente marinho e pode ser isolada a partir de moluscos bivalves. Foi relatada a presença de *V. alginolyticus* em surtos epizooticos em cultivos no Mediterrâneo, causando mortalidade do pescado, danos em moluscos e crustáceos, e importantes perdas econômicas (BALEBONA et al., 1998; HÖRMANSDORFER et al., 2000).

Este microrganismo foi originalmente classificado como biótipo 2 de *V. parahaemolyticus*. Esta bactéria não está associada a casos de gastroenterite e, portanto, tem sido reconhecida como microrganismo oportunista cujo isolamento é maior a partir de infecções extra - intestinais como nos casos de infecções superficiais, otites e conjuntivites em pacientes expostos ao ambiente marinho contaminado. Embora a infecção, na maioria das vezes, seja autolimitante, indivíduos imunodeprimidos são bastante suscetíveis a esse patógeno (LOPES, 1993; CHIEN et al., 2002; JAKSIÉ et al., 2002). Durante períodos de clima quente, *V. alginolyticus* pode alcançar concentrações no mexilhão suficiente para causar doença em humanos (RIPABELLI et al., 2002).

2.4.5 Outras espécies de *Vibrio*

Vibrio carchariae, espécie isolada de tubarões, é considerado como parte da microbiota normal, porém pode determinar quadro patológico quando o animal está sob estresse. A infecção humana pode ocorrer resultante de acidente com mordedura por este animal, o que levanta a possibilidade de que a capacidade de agressão ocorra em condições oportunistas. Estudos realizados em algumas espécies de peixes de cultivo o apontam como agente etiológico de infecções. Trata-se de uma espécie presente em ambientes aquáticos, mas somente há alguns anos foi isolada, a partir de uma infecção humana extra-intestinal (LEE et al., 2002). *Vibrio carchariae* é fenotipicamente similar ao *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* diferenciando-se destes pela ausência de hidrólise de gelatina a 22°C, motilidade negativa a 36°C e reação de ornitina descarboxilase negativa (LOPES, 1993, YII et al., 1997, NICOLAS et al., 2002).

Infecções por *Vibrio damsela* são raras e poucos são os dados presentes na literatura. É responsável por produzir infecções de feridas ao homem, principalmente após a exposição à água do mar (TANG; WONG, 1999; SCOGLIO et al., 2001).

Vibrio cincinnatiensis foi isolado do líquido cefalorraquidiano de um paciente com 70 anos com bacteremia e meningite. No entanto, seu isolamento não é frequente.

Vibrio fluvialis foi isolado a partir de pacientes com quadros de diarreia. Esta espécie foi isolada em coproculturas de mais de 500 pacientes com diarreia em Bangladesh, em 1976, devido o consumo de ostras *in natura*. Nos Estados Unidos, o microrganismo foi isolado de ferida de um paciente do Havaí, da água e sedimentos da baía de Nova York e de mariscos de Louisiana (VARGHESE et al., 1996; MAUGERI et al., 2000; HEIDELBERG et al., 2002; CAVALLO; STABILI, 2002).

Trata-se de um patógeno entérico capaz de produzir hemolisina extracelular (KOTHARY et al., 2003). No Brasil, o primeiro caso de infecção por *V. fluvialis* foi descrito por Magalhães et al. (1996). Atualmente este microrganismo tem sido associado a casos de diarreia severa em pacientes imunocomprometidos ou crianças, podendo o quadro evoluir para bacteremia (LESMANA et al., 2002; HUANG et al., 2005; LAI et al., 2006).

Vibrio furnissii, antes denominado *V. fluvialis* biogrupo 2 foi isolado de pacientes com gastroenterite aguda durante dois surtos de envenenamento por alimentos e de fezes de um lactente de 1 mês de idade (MAGALHÃES et al., 1996; CHAKRABORTY et al., 1997).

Vibrio hollisae foi isolado de amostras de fezes de pessoas com diarreia após a ingestão de frutos do mar crus. Os sintomas comuns a todos os pacientes foram dor abdominal e leucocitose. Foram relatados casos raros de infecção sistêmica produzida por este microrganismo, sendo a maioria pacientes com imunodeficiência. Alguns estudos apontam a presença de uma hemolisina semelhante a TDH do *V. parahaemolyticus* que seria responsável pela sua patogenicidade, paralelamente a uma enterotoxina sensível ao calor (CARNAHAN et al., 1994; LESMANA et al., 2002).

Vibrio vulnificus, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. splendidus*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* têm sido reportadas como as principais espécies do gênero *Vibrio* que representam risco para o cultivo de camarões (LIGHTNER, 1996). Da mesma forma, espécies como *V. anguillarum*, *V. tapetis* e *V. harvey* são responsáveis por causar infecções em pescado. *V. anguillarum* é responsável por causar septicemia hemorrágica em peixes. Os peixes infectados apresentam descoloração da pele e eritema ao redor das barbatanas, guelras e boca. Sua taxa mortalidade em uma fazenda de peixes infectados gira em torno de 30 a 100% (DENKIN; NELSON, 2004).

2.5 Gênero *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* é constituído por bacilos Gram-negativos, podendo ou não ser móveis por flagelos polares, não esporulados, fermentadores, anaeróbios facultativos e que apresentam reação de oxidase, característica que o distingue das Enterobacteriaceae. Apesar deste gênero ser conhecido como patógeno de peixes desde 1894 (KIRKAN et al., 2003) a sua classificação taxonômica só foi estabelecida recentemente. Inicialmente o gênero *Aeromonas* era considerado pertencente à família Vibrionaceae, no entanto, com avanço das técnicas moleculares, surgiu-se a criação da família Aeromonadaceae, da qual o gênero *Aeromonas* faz parte (GRANUM et al., 1998; ABBOT et al., 2003; MATTÉ, 2004; ØRMEN et al., 2005). Atualmente são reconhecidas 14 espécies de *Aeromonas* por meio de características bioquímicas e análise de DNA (ØRMEN et al., 2005).

Os microrganismos do gênero *Aeromonas* não são relacionados a condições sanitárias inadequadas por não terem correlação com microrganismos indicadores de contaminação fecal. Segundo Brasil (2001), a pesquisa de *Aeromonas* spp. não é um parâmetro de qualidade microbiológica considerada pela legislação brasileira, porém diversos estudos têm demonstrado espécies patogênicas relacionadas a alimentos (VILLARI et al., 2003). As bactérias do gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídas pelo ambiente aquático, sendo isolados de peixes, ostras, camarões e mexilhões. Apesar destes microrganismos terem sido isolados e identificados primeiramente de águas marinhas e salobras, a literatura relata o isolamento de *Aeromonas* de água potável destinada ao abastecimento público (SEM; RODGERS, 2004; PAVLOV et al., 2004) e água mineral engarrafada, evidenciando sua importância para a Saúde Pública (VILLARI et al., 2003; PIANETTI et al., 2005; VENIERI et al., 2006). Apesar do predomínio em alimentos de origem aquática, ocorre também uma alta incidência de diversas espécies de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem não aquática como vegetais, carne vermelha e de aves representando um alerta para a saúde pública no que se refere a vigilância sanitária. Também podem ser isolados de carnes bovinas e suínas, leite cru, vegetais e saladas (HARF-MONTEL et al., 2004; SZCZUKA; KAZNOWSKI, 2004).

Em humanos, as espécies de *Aeromonas* são responsáveis por gastroenterites, caracterizando-se por diarreia aguda, aquosa autolimitada, de curta duração, podendo ser acompanhada de febre, vômitos e dor epigástrica assemelhando-se à síndrome causada por *V.*

cholerae O1. Manifestações extraintestinais como infecções cutâneas, hepatobiliares, urinárias, oculares, endocardites, osteomielites, bacteremias, e celulite ou infecção de feridas em manipuladores de alimentos ou profissionais de sistemas de aquicultura tem sido associada a presença de *Aeromonas*. Casos mais graves podem ocorrer em indivíduos com comprometimento do sistema imunológico ou distúrbios hepatobiliares. (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003; SZCZUKA; KAZNOWSKI, 2004). Segundo Kingombe et al. (2004), apesar do aumento de trabalhos evidenciando este gênero, poucos relatos de surtos foram evidenciados, provavelmente devido a inexistência de um método simples e rápido padronizado para sua identificação.

2.6 Enterobactérias

A família Enterobacteriaceae é constituída por bastonetes Gram-negativos geralmente associados a infecções intestinais, podendo ser encontrada nos mais diversificados ambientes. Os membros desta família são importantes patógenos humanos que podem causar desde uma gastroenterite leve a severa aos mais variados tipos de infecção tais como infecções do trato urinário, pneumonias, meningites e septicemia (MORELLI et al., 2003).

A família Enterobacteriaceae é composta por gêneros como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*.

A presença de *E. coli* é relatada particularmente em infecções gastroentéricas, tanto em indivíduos imunocomprometidos, como indivíduos saudáveis após a ingestão de alimentos contaminados, principalmente de moluscos bivalves sem prévia cocção. Sua presença em alimentos indica contaminação de origem fecal, apontando condições higiênicas insatisfatórias (BRASIL, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2003; VIEIRA et al., 2004). Além de *E. coli* a presença de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella* e *Shigella* estão associados a quadros gastroentéricos humanos (MORELLI et al., 2003).

O gênero *Salmonella* é amplamente distribuído na natureza, sendo o trato intestinal de pássaros e répteis seus principais reservatórios. Podem alcançar o ambiente aquático através de contaminação fecal e então, serem detectadas em peixes e produtos pesqueiros. As aves têm importante papel na transmissão do patógeno, pois podem ser portadoras assintomáticas, excretando continuamente salmonelas pelas fezes. As infecções causadas por *Salmonella* spp. podem decorrer da ingestão de carnes, principalmente mal cozidas ou cruas, ovos, leite cru e hortaliças contaminados (GERMANO; GERNMANO, 2003; FRANCO; LANDGRAF, 2003; VIEIRA et al., 2004). A presença de *Salmonella* em alimentos indica inadequação do produto para o consumo, constituindo um sério problema para a saúde pública (ANVISA, 2001).

A transmissão das enterobactérias se dá por via fecal-oral, através de alimentos contaminados por portadores, durante o processo de preparação e manipulação. A água também pode ser um veículo de transmissão, podendo ser contaminada no próprio manancial, por ser tratada inadequadamente ou ainda por contaminação na rede de distribuição (BASTOS, 2000).

Os principais sintomas de infecção por enterobactérias são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, sudorese e febre (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A principal causa de doenças diarreicas é a ingestão de alimentos e/ou águas contaminadas por microrganismos patogênicos. A presença de *E. coli* em água ou alimento indica contaminação de origem fecal e um possível risco à saúde.

Em geral, a maioria dos países, incluindo o Brasil, submetem a liberação do consumo de mexilhões aos resultados da análise dos níveis de coliformes fecais e *Escherichia coli* presentes no ambiente. No entanto, há grande diversidade de critérios quanto aos níveis de

coliformes fecais permitidos tanto na água de cultivo quanto na carne do mexilhão. Em nosso país, a ANVISA, através da RDC 12/2001, dispõe que os moluscos bivalves resfriados ou congelados devem ter no máximo 5 x 10⁶ UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de coliformes a 45 °C/g (5000 UFC/100g). No México, por outro lado, a legislação para coliformes fecais presentes na carne dos mexilhões é bem mais restritiva e prevê no máximo 230 UFC/100g. No Canadá, a legislação referente aos coliformes fecais na carne dos mexilhões é ainda mais rigorosa, permitindo apenas 170 UFC/100g.

2.7 Resistência Antimicrobiana

Os antibióticos têm desempenhado um importante papel no combate de doenças humanas e de animais aquáticos cultivados, no entanto, o uso indiscriminado na aqüicultura pode acarretar problemas de saúde pública, como a possível toxicidade de algum antimicrobiano aos manuseadores dos animais, modificação da microbiota dos consumidores e transferência da resistência à droga a patógenos humanos o que pode dificultar o tratamento das doenças no homem (VIEIRA et al., 2000).

O uso indiscriminado de antibióticos em populações animais tem sido motivo de preocupação na comunidade acadêmica, em virtude do aumento da circulação de bactérias patogênicas resistentes entre animais e humanos (MENDES et al., 2004). Embora o tratamento com antibióticos seja, talvez, a maneira mais rápida de se obter resposta a uma doença bacteriana na aqüicultura, por outro lado pode acarretar em graves problemas, pois podem induzir resistência quando utilizadas tanto em baixas doses, como também em doses elevadas.

A resistência antimicrobiana pode estar associada a diversos fatores como o lançamento de esgoto doméstico e industrial, inclusive da área farmacêutica, diretamente no ecossistema aquático, pela deposição de quimioterápicos no lixo comum e também pelo uso indiscriminado de antibióticos, seja pela administração de doses subterapêuticas ou sua utilização como promotores de crescimento em animais de produção (SOTOMAYOR; BALCÁZAR, 2003).

Na década de 90, a maioria dos países europeus banuiu o uso de drogas como a penicilina e a tetraciclina como promotores de crescimento de animais de produção (gado de corte e outros), no entanto, países como os Estados Unidos e muitos países da América Latina não procederam da mesma maneira o que pode estar relacionado aos inúmeros problemas gerados pela resistência bacteriana a essas drogas (AARESTRUP, 2000; OMS, 2001).

A resistência antimicrobiana frente a determinados antibióticos é um tipo de adaptação microbiana que pode causar doenças veiculadas por alimentos ainda mais graves. Cepas que eram suscetíveis a praticamente todos os agentes antimicrobianos durante décadas, atualmente têm se mostrado resistentes não somente aos usados na terapêutica clássica, mas também à novas drogas. Alguns microrganismos desenvolveram resistência a múltiplas drogas, sendo denominados multirresistentes (TAUXE, 2002).

O interesse em realizar o presente estudo partiu da necessidade em caracterizar as espécies bacterianas associadas aos bivalves incrustados próximos a cabos subaquáticos e determinar sua importância em Saúde Pública, devido à exposição dos profissionais envolvidos no processo de manuseio destes cabos, tanto no ambiente subaquático como na superfície. A manutenção dos cabos subaquáticos demanda uma elevada alocação de recursos técnicos e financeiros, em função do desgaste do material, devido a fatores bióticos e abióticos, podendo dentre os fatores bióticos ocorrer o envolvimento de espécies bacterianas capazes de causar a degradação de materiais constituintes dos cabos. Associado a este fato, a presença do cabo, como substrato consolidado, leva o surgimento de um novo ecossistema

devido a incrustação por ostras, mexilhões, algas e outros animais atraindo conseqüentemente, peixes para a região. Sendo assim, a atividade pesqueira aumenta nas regiões próximas a cabos subaquáticos, o que pode representar um problema a saúde de pescadores ao realizarem pesca de arrasto, onde suas redes ficam aprisionadas aos cabos e no momento de sua retirada pode ocasionar danos ao cabo subaquático e ao pescador, devido a presença de bactérias com potencial patogênico presentes em animais incrustados nos cabos.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos:

- Executar o levantamento e a identificação da microbiota bacteriana a partir de moluscos bivalves incrustados em costões rochosos no Arquipélago de Santana – Macaé – RJ, próximo a cabos subaquáticos;

- Avaliar por meio de métodos tradicionais, o fenótipo de resistência aos agentes antimicrobianos dos isolados bacterianos de mexilhões;

- Avaliação microbiológica da qualidade da água e as possíveis contaminações decorrentes das atividades pesqueiras e subaquáticas nesta região e estabelecer posições críticas sobre questões socioeconômicas e ambientais na região.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ponto de Coleta

O ponto de coleta foi estabelecido no Arquipélago de Santana (anexo 01 - figura 01), localizado na Baía de Campos, Macaé, Estado do Rio de Janeiro a uma distância de aproximadamente 10 km da costa. Localiza-se na costa Leste de Macaé nas coordenadas 22° 23' 45.43'' S – 41°43' 42.52''W. A ilha de Santana é a maior com aproximadamente 1,29 km² de área e altura de 156 m no ponto mais alto e, é composto de três elevações. A ilha do Francês tem uma área aproximada de 0,35 km² e altura máxima em torno de 60 m. O Ilhote do Sul tem área de 0,12 km² e, altura máxima também de 60 m. Por ser o único arquipélago em todo o litoral da região é avistado a grandes distâncias. O arquipélago tem apenas duas praias, uma, maior, na parte noroeste da ilha de Santana e outra, bem menor, na parte oeste da ilha do Francês. Ambas são bem protegidas dos ventos e, por isso, mesmo propícias para banho, apresentando areias claras e água transparente é atualmente área de proteção ambiental (BELTRÃO, 1995).

3.2 Análise Microbiológica da Água do Mar

3.2.1 Amostragem

Foram utilizados potes de plásticos estéreis com capacidade para 1L de água. A coleta da água foi efetuada em 3 e 13 m de profundidade através de mergulho autônomo. O estabelecimento dessas profundidades objetivou avaliar a possível interferência da coluna de água sobre a microbiota. Após a coleta o material foi mantido sobre refrigeração e transportado imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para realização da análise bacteriológica.

3.2.2 Processamento das amostras

Para o processamento da análise microbiológica da água utilizou-se 25 mL da amostra, a qual foi adicionada em 225 mL de solução salina 0,85%. A partir desta primeira diluição 10⁻¹ realizou-se diluições seriadas retirando-se uma alíquota de 1 mL da primeira diluição e colocados em 9 mL de solução salina. Este procedimento foi realizado até a obtenção da diluição 10⁻⁶.

3.2.2.1 Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes a 45°C, utilizou-se a técnica de fermentação em tubos múltiplos, segundo Feng et al. (2002). O volume de 1 mL, proveniente de cada uma das diluições previamente obtidas (10⁻¹ a 10⁻⁶), foi inoculado em séries de três tubos contendo Caldo Lauryl Sulfato – LST (Difco), com tubos de Durham. Em sequência, foram incubados a 35°C por 48 horas. Após esse período, os tubos turvos com produção de gás foram considerados positivos e deles foram retiradas alíquotas, as quais foram transferidas para tubos de caldo *Escherichia coli* – EC (Difco), incubados a 45°C por 24 horas. A determinação do NMP de coliformes termotolerantes a 45°C foi efetuada segundo a orientação de Garthright (2001). A partir dos tubos que apresentaram resultados positivos no Caldo EC, indicados pela presença de gás, foram retiradas alíquotas para semeadura por estriamento, sobre a superfície do meio ágar Eosina Azul de Metileno- EMB (Difco) e incubação a 37°C, por 24 horas. Após este período, foram isoladas duas a três colônias típicas de *E. coli* para o meio Agar Triptona de Soja-TSA (Difco), cujo crescimento foi empregado para avaliar a produção de indol em meio de SIM (Difco), via metabolismo de utilização da glicose, pela reação de Vermelho de Metila e

produção de acetoína pelo teste de Voges Proskauer (Difco), e capacidade de utilização do Citrato (Micromed) como fonte única de carbono, de acordo com Feng et al. (2002).

3.3 Análise Microbiológica dos Mexilhões

3.3.1 Amostragem

Os mexilhões da espécie *Perna perna* foram coletados, em 3 diferentes momentos, no período de junho de 2007 a maio de 2008. Em cada coleta, foram extraídos 2 lotes de 25 indivíduos adultos, apresentando as valvas fechadas e de tamanho utilizado para comercialização (maiores que 6 cm). Os animais foram extraídos diretamente do costão rochoso, em profundidades variando de 3 a 4 metros, através de mergulho autônomo. Tal procedimento foi realizado para evitar a coleta de animais em locais mais rasos, sujeitos a vazantes de maré e, portanto mais expostos a variações de temperatura e incidência solar direta. Em seguida, estes organismos foram acondicionados em sacos de polietileno dentro de caixa de isopor contendo gelo e transportados imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para realização da análise bacteriológica. O transporte dos mexilhões sob resfriamento teve como objetivo evitar a morte da maioria dos animais e o conseqüente crescimento de sua microbiota.

3.3.2 Processamento das amostras

Os lotes foram separadas, adotando-se o mesmo procedimento para cada uma. Os mexilhões (anexo 01 – figura 02) foram lavados individualmente com auxílio de escova, sob água corrente potável, para a retirada de sujidades. Durante este processo, foram descartados os animais que apresentavam valvas abertas. Em capela de fluxo laminar, próximo ao bico de Bunsen, os mexilhões foram abertos assepticamente com bisturi estéril. A massa corpórea e o líquido intravalvar foram recolhidos em becher, onde foi realizada, com auxílio de pinça e bisturi esterilizados, a trituração das partes sólidas a fim de promover homogeneização do material. Para a pesquisa de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. foram pesados 25g da amostra e adicionados a 225 mL de água peptonada alcalina (APA) com 1% de NaCl. A partir desta diluição (10^{-1}), de cada amostra, foi tomada uma alíquota de 1mL e acrescentada em tubo contendo 9 mL de APA com 1% de NaCl (diluição 10^{-2}), e a outro com 9 mL de APA com 3% de NaCl (diluição 10^{-2}), sendo usados como meios de enriquecimento. Em seguida, estes foram incubados à 37°C por 12 a 24 horas. A pesquisa de Enterobactérias seguiu-se basicamente a mesma metodologia utilizada para *Vibrio* spp. diferenciando-se apenas na não utilização de NaCl em APA. Após o crescimento em APA, as amostras foram semeadas em Agar EMB e MacConkey (FDA, 1995).

3.4 Pesquisa de Microrganismos com Potencial Patogênico

3.4.1 Pesquisa de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp.

As amostras que apresentaram crescimento em APA com 1% e 3% de NaCl foram isoladas em Agar Tiosulfato Citrato Sais Biliares Sacarose (TCBS-Oxoid) acrescidas de 1%, 2% e 3% de NaCl, em duplicata e Agar Seletivo para *Pseudomonas*-*Aeromonas* (GSP-Micromed) acrescido de 1% de NaCl, em duplicata. Todas as placas foram incubadas à 37°C por 24 horas. As crescentes concentrações de NaCl utilizadas em Agar TCBS tiveram como objetivo tornar este meio mais seletivo, favorecendo crescimento de bactérias com diferentes graus de halofilia (FDA, 1995). Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram e a prova do KOH a 3%, onde a formação de gel viscoso indicou resultado positivo (KONEMAN et al., 2001).

Foram transferidas até 10 colônias isoladas de cada placa de TCBS (anexo 01 – figura 03), apresentando coloração amarela (sacarose positivo) ou verde (sacarose negativo) e

colônias amarelas (amido positivo) isoladas do ágar GSP (anexo 01 – figura 04) para tubos contendo Agar Nutriente (Micromed), LIA (Ágar Lisina Ferro-Micromed) e Agar Kligler (Micromed), todos acrescidos de 1% de NaCl e submetidos a incubação à 37°C por 24 horas para diferenciação presuntiva entre muitos *Vibrio* spp., e enterobactérias. Posteriormente a diferenciação entre estes microrganismos foi realizada através da enzima citocromo oxidase, distinguindo *Vibrio* spp. dos membros de Enterobacteriaceae. A prova da oxidase foi realizada a partir do crescimento dos isolados em ágar nutriente inclinado contendo 1% de NaCl. Foi retirada uma alíquota com emprego da alça de platina e foram feitos esfregaços em fitas PROBAC impregnadas com cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina. O teste foi considerado positivo quando do aparecimento de uma coloração azul arroxado em 10 segundos. Essa prova é considerada positiva para os todos os membros da família Vibrionaceae e Aeromonadaceae, a exceção do *V. metschnikovii* (FDA, 1995; OLIVER; KAPER, 1997).

3.4.1.1 Identificação fenotípica dos isolados

3.4.1.2 Fermentação de açúcares

A fermentação de açúcares foi testada utilizando-se APA acrescida de 1% de NaCl, 1% do açúcar em questão e 1% do Indicador de Andrade. A produção de ácido, indicado pela diminuição do pH e conseqüente mudança de cor, foi avaliada através da coloração rosa após 24 horas de incubação na temperatura de 37°C. Os açúcares avaliados foram: glicose, manitol, lactose, sacarose, arabinose, celobiose, maltose e manose (Micromed). Nos tubos de ensaio contendo a solução de glicose foram inseridos tubos de Durham para a observação da produção de gás, a qual caracteriza esta prova como positiva (KONEMAN et al., 2001).

3.4.1.3 Descarboxilação de lisina e ornitina e dehidrolização de arginina

Para a realização das provas de descarboxilação de lisina e ornitina e dehidrolização de arginina, foi utilizada uma base contendo peptona, extrato de levedura, dextrose e púrpura de bromocresol, acrescida de 1% de NaCl, com a qual foram preparadas as soluções de lisina, arginina e ornitina (Micromed). As soluções foram distribuídas em tubos aos quais foi adicionada uma fina camada de óleo mineral à superfície do líquido, a fim de promover ambiente microaerófilo. Como controle, utilizou-se a solução base pura também acrescida de óleo mineral (KONEMAN et al., 2001).

Após a inoculação dos isolados e incubação à 37°C por até 7 dias, a leitura destas provas foi interpretada como negativa quando a coloração do meio apresentava-se amarela indicando acidez em ocasião da fermentação da glicose. Na reação positiva, ocorria fermentação do meio para ativação das enzimas de descarboxilação e posteriormente o meio virava para coloração violeta, indicando basicidade do meio em função da descarboxilação ou dehidrolisação do aminoácido. A base usada como controle sempre apresentou resultado negativo (KONEMAN et al., 2001).

3.4.1.4 Avaliação da halofilia

Utilizando-se agulha bacteriológica os isolados foram inoculados em tubos com água peptonada alcalina com diferentes concentrações de NaCl (0%, 3%, 6%, 8% e 10%) e incubados a 37°C por 24 horas. A turvação observada no tubo indicou o crescimento bacteriano, caracterizando o grau de halofilia do isolado testado (FDA, 1995).

3.4.1.5 Sensibilidade ao O/129

Para este procedimento, os isolados foram inoculados em APA com 1% NaCl, incubados durante 18 horas a 37°C e diluídas na concentração do tubo 0,5 da escala de

McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL.

Uma suspensão bacteriana (0,5mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido ágar Müeller Hinton (MH - Micromed) com 1% de NaCl com o auxílio da alça de Drigalski. Em cada placa semeada, foi depositado um disco de 6 mm de diâmetro impregnado com O/129 na dosagem de 10µg e outro na dosagem de 150µg, distantes entre si aproximadamente 4 cm, sendo todas as placas incubadas a 37°C por 12 a 24 horas (anexo 01 – figura 05). A leitura foi realizada através da observação do halo de sensibilidade ou crescimento bacteriano ao redor do disco de O/129, considerando o isolado como sensível ou resistente, respectivamente (JANDA et al., 1998).

3.4.1.6 ONPG (orto-nitrofenil beta galactosidase)

Este teste é utilizado para detecção da enzima galactosidase, utilizando-se discos de diferenciação de ONPG (Bacto®), recomendados para a detecção da presença desta enzima, objetivando a identificação de microrganismos fermentadores tardios de lactose. A partir do crescimento em Ágar Klinger contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alçada de cada cultura e suspensa em 0,2 mL de solução salina (0,85% de NaCl) em tubo de ensaio. Cada tubo recebeu um disco de ONPG e após incubação à 37°C por 24 horas realizou-se a leitura. A reação positiva foi caracterizada pela coloração amarela na solução salina, oriunda da hidrólise do ONPG, pela liberação de ortonitrofenol (KONEMAN et al., 2001).

3.4.1.7 Prova de motilidade e produção de indol

Para as provas de motilidade e produção do indol, utilizou-se Agar sulfeto indol motilidade (SIM - Vetec) acrescido de 1% de NaCl. Após inoculação em picada com auxílio de alça moldada em agulha, incubou-se a 35° por 24 a 48 horas. A interpretação do teste de motilidade foi realizada através da observação do tubo contra a luz sendo possível visualizar o tipo de crescimento da colônia, sendo considerado motilidade negativo o microrganismo crescido apenas na linha inoculada e positivo o que ultrapassou a mesma. A leitura da produção de indol, resultada da degradação metabólica do aminoácido triptofano, foi realizada adicionando-se gotas de reativo de Kovacs (para-dimetilaminobenzaldeído em álcool) no tubo. A mudança de coloração do reativo de amarela para vermelha indica a presença de indol, sendo a prova considerada positiva (KONEMAN et al., 2001).

3.4.1.8 Prova de Voges-Proskauer (VP) e Vermelho de Metila (VM)

O caldo MR-VP acrescido de 1% de NaCl apresenta na sua composição glicose, peptona, água e fosfato e é utilizado para a leitura da reação de VM-VP. A utilização da glicose, apresentando a produção de acetilmetilcarbinol, é indicada pela coloração rosa na prova do VP após a adição de 0,2 mL de α -naftol a 5% e 0,6 mL de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 a 48 horas a 35°C. A prova do VM é utilizada para a detecção de ácidos mistos. É detectado através da viragem da coloração do caldo para vermelho após a adição do reativo vermelho de metila (KONEMAN et al., 2001).

3.4.1.9 Redução de nitrato

Para avaliação da redução de nitrato, foi utilizado caldo contendo nitrato de potássio (KNO_3). A leitura da redução do nitrato a nitrito foi realizada adicionando-se em uma lâmina, uma gota do caldo inoculado após 24 horas a 35°C e, uma gota de ácido sulfanílico e outra de α -naftilamina, reativos A e B de Griess Ilosway. A coloração rósea avermelhada indica presença de nitrito no caldo e, conseqüentemente prova de redução positiva (KONEMAN et al., 2001)..

3.4.2 Pesquisa de enterobactérias

As amostras foram repicadas em meios seletivos e diferenciais como ágar Mac Conkey (MC - Merck) e Eosina Azul de Metileno (EMB - Merck) e submetidas ao método de Gram, teste da catalase, prova do KOH a 3%, onde a formação de gel viscoso indicou resultado positivo. Posteriormente realizou-se a identificação presuntiva das colônias através da prova do citocromo oxidase, redução do nitrato e fermentação de glicose com produção de gás. Posteriormente, as seguintes provas de identificação foram realizadas: comportamento em ágar tríplice açúcar-ferro (TSI - Merck), motilidade em tubo, produção do indol, fermentação de açúcares, hidrólise, produção de urease, degradação do citrato e do malonato, e outros diferenciais de acordo com o microrganismo envolvido (KONEMAN et al., 2001).

Para pesquisa de *Salmonella* spp. foi transferido 1 mL do crescimento em APA após 24 horas para 9 mL de Caldo Tetrionato e incubados por 24h a 35°C. Após este período semeou-se por esgotamento, uma alçada do caldo em placas contendo Agar Salmonella-Shigella (SS-Merck) e incubadas por 24h a 35°C. Após incubação, observa-se o crescimento típico de colônias de *Salmonella* spp. como colônias transparentes com o centro negro (KONEMAN et al., 2001).

3.4.2.1 Comportamento em ágar TSI (Três Açúcares e Ferro)

Prova utilizada para avaliar a fermentação de carboidratos. Esta diferenciação é feita atendendo às diferenças na fermentação dos hidratos de carbono presentes no meio e à produção de sulfeto de hidrogénio (H₂S). O TSI contém glicose em pequena concentração (0,1%), lactose e sacarose em concentração superior (1%), o indicador do pH, vermelho de fenol, para detectar a produção de ácidos resultantes da fermentação dos hidratos de carbono, tiosulfato de sódio, substrato para a produção de H₂S, e sulfato de ferro para a detecção desse produto final. Após incubação podem ser determinadas as atividades fermentativas, a produção de gás e a produção de H₂S (KONEMAN et al., 2001).

3.4.2.2 Hidrólise de gelatina

A capacidade de hidrolisar gelatina através da enzima gelatinase, foi testada inoculando uma partícula da colônia em meio gelatina (Micromed) e incubando em estufa bacteriológica a 35°C por 24 a 48. Em seguida, os tubos foram levados em geladeira por 15 minutos para realização da leitura, nos tubos onde a gelatina permaneceu liquefeita mesmo após o resfriamento, foram considerados positivos (KONEMAN et al., 2001; RHODEHAMEL, 2001).

3.4.2.3 Produção de urease

A enzima urease é detectada quando o microrganismo cresce num meio de uréia (meio de Christensen) que contém também o indicador de pH, vermelho de fenol. Quando a uréia é quebrada pela urease, a amônia acumula-se no meio tornando-o alcalino. Este aumento de pH faz com que o indicador de pH passe de amarelo a rosa, sendo uma reação positiva para a presença de urease. A ausência da coloração rosa indica uma reação negativa (KONEMAN et al., 2001).

3.4.2.4 Degradação do citrato

A capacidade do microrganismo utilizar o citrato como única fonte de carbono foi avaliado através da inoculação dos isolados no Agar citrato Simmons. Após incubação por 24h a 35°C foi observado a coloração dos tubos, onde a alteração de verde para azul, indicava alcalinização do meio após a utilização do citrato (KONEMAN et al., 2001).

3.4.2.5 Degradação do malonato

A capacidade do microrganismo utilizar o malonato como única fonte de carbono foi avaliado através da inoculação dos isolados em caldo malonato. Após incubação por 24h a 35°C foi observado a coloração dos tubos, onde a alteração de verde para azul, indicava alcalinização do meio após a utilização do malonato (KONEMAN et al., 2001).

3.5. Perfil de Suscetibilidade dos Microrganismos Isolados aos Fármacos de Eleição

Após identificação, os isolados bacterianos foram submetidos aos testes de suscetibilidade através da técnica de difusão em disco. Para o gênero *Vibrio* spp. (anexo 01 – figura 06) foram utilizados os seguintes discos antimicrobianos (SENSIFAR-CEFAR®): tetraciclina (30 µg), cefoxitina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), sulfametoxazol-trimetropim (23,75 µg-1,25 µg), pefloxacina (5 µg) e ampicilina (10 µg). Para a família Enterobacteriaceae foram utilizados discos de norfloxacina (10 µg), levofloxacina (5 µg), imipinem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), cefoxitina (30 µg) e sulfametoxazol-trimetropim (23,75 µg-1,25 µg) (CLSI, 2005).

3.5.1 Inóculo

Os isolados foram inoculados em caldo Müeller Hinton (Micromed) acrescido de 1% de NaCl, incubados durante 18 horas a 37°C e diluídas na concentração do tubo 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL.

3.5.2 Difusão em disco

A suspensão bacteriana (0,5mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido (ágar Müeller Hinton acrescido de 1% de NaCl) com o auxílio da alça de Drigalski. Foram avaliadas as concentrações terapêuticas dos fármacos testados já presentes em discos de sensibilidade. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 18 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (CLSI, 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise Microbiológica do Mexilhão

A qualidade higiênico-sanitária de produtos de origem animal é o fator principal para assegurar a produção de um produto de qualidade e inócuo para a saúde humana. Os moluscos bivalves são organismos filtradores que acumulam microrganismos do meio ambiente e sua segurança como alimento para o homem está diretamente relacionada à qualidade bacteriológica da água em que se desenvolve. Neste sentido, este organismo tem sido utilizado como excelente parâmetro da qualidade ambiental. A tabela 01 relata o número de microrganismos isolados em cada coleta.

Tabela 01. Número de espécies bacterianas isoladas em cada coleta.

| Espécies de Bactérias Isoladas | Coletas realizadas | | |
|--------------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|
| | Junho 2007 (n=24) | Fevereiro 2008 (n=16) | Mai 2008 (n= 31) |
| <i>V. alginolyticus</i> | 03 | 03 | 02 |
| <i>V. anguillarum</i> | 01 | - | 01 |
| <i>V. carchariae</i> | - | 01 | - |
| <i>V. damsela</i> | 05 | 02 | 08 |
| <i>V. fluvialis</i> | - | - | 04 |
| <i>V. harveyi</i> | 04 | 03 | 05 |
| <i>V. hollisae</i> | - | 01 | - |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 02 | 01 | - |
| <i>V. vulnificus</i> | - | - | 02 |
| <i>Citrobacter diversus</i> | 01 | - | - |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 01 | - | - |
| <i>Enterobacter aerogens</i> | - | - | 01 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 01 | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> | 02 | 02 | 02 |
| <i>Hafnia alvei</i> | - | - | 02 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 02 | 01 | 01 |
| <i>Serratia marcescens</i> | 01 | 01 | - |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 01 | 01 | - |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | - | - | 03 |

4.1.1 Pesquisa de *Vibrio* spp.

A partir das análises bacteriológicas das três coletas efetuadas, foi obtido um total de 51 colônias de *Vibrio* spp. (Gráfico 01) isoladas com prevalência da espécie *V. damsela* (n=15), seguida de *V. harveyi* (n=12), *V. alginolyticus* (n=08), *V. fluvialis* (n=04), *Vibrio* spp. (n=03), *V. parahaemolyticus* (n=03), *V. anguillarum* (n=02), *V. vulnificus* (n=02) e *V. carchariae* (n=01). A tabela 01 mostra o número de espécies de *Vibrio* isoladas em cada coleta.

Gráfico 01. Distribuição de espécies de *Vibrio* isoladas.

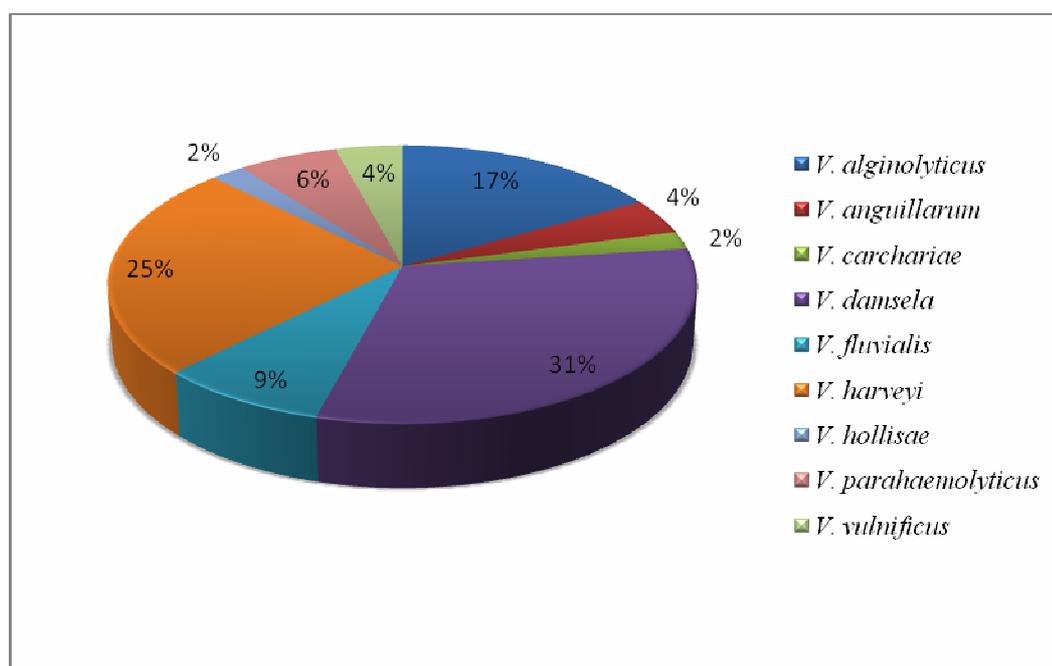


Tabela 02. Número de espécies de *Vibrio* isoladas em cada coleta.

| Espécies de <i>Vibrio</i> Isoladas | Coletas realizadas | | |
|------------------------------------|--------------------|-----------------------|------------------|
| | Junho 2007 (n=15) | Fevereiro 2008 (n=12) | Mai 2008 (n= 24) |
| <i>V. alginolyticus</i> | 03 | 03 | 02 |
| <i>V. anguillarum</i> | 01 | - | 01 |
| <i>V. carchariae</i> | - | 01 | - |
| <i>V. damsela</i> | 05 | 02 | 08 |
| <i>V. fluvialis</i> | - | - | 04 |
| <i>V. harveyi</i> | 04 | 03 | 05 |
| <i>V. hollisae</i> | - | 01 | - |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 02 | 01 | - |
| <i>V. vulnificus</i> | - | - | 02 |
| <i>Vibrio</i> spp. | - | 01 | 02 |

Segundo Baffone et al. (2000), relatos de infecção por *Vibrio* spp. em humanos têm sido associados com ambientes aquáticos contaminados com essas bactérias, indicando a importância de monitoramento sistemático das cepas ambientais e a necessidade de definir seus possíveis potenciais patogênicos e seus significados clínicos. Existem fortes razões para a execução de um controle constante de moluscos e peixes marinhos devido aos riscos relacionados a *Vibrio* spp. e às síndromes clínicas acarretadas (JAKSIÉ et al., 2002).

O isolamento de *V. parahaemolyticus* (n=03) assume destacado papel epidemiológico devido à ocorrência de surtos epidêmicos ou casos esporádicos, após a ingestão de alimentos marinhos consumidos *in natura* ou parcialmente submetidos à cocção (CABRERA et al., 2004), ou por infecções através de abrasões (RODRIGUES et al., 2001).

O isolamento de *V. alginolyticus* (n=08) em amostras de mexilhões *in natura* reforça a importância epidemiológica associada ao surgimento de diarreia e infecções em feridas, particularmente em indivíduos que manipulam os mexilhões (RODRIGUES et al., 2001).

A baixa frequência de isolamento de *V. hollisae* (n=01), *V. carchariae* (n=01) e *V. anguillarum* (n=02), importantes patógenos isolados de fontes animais, quando comparados com os demais microrganismos isolados, reflete provavelmente as condições microbiológicas do habitat dos mexilhões avaliados, tais como pH, salinidade, temperatura e nutrientes da água (LEE et al., 2002; YENG; BOOR, 2004).

Ripabelli et al. (1999) ao avaliarem 30 isolados de *Vibrio* spp. a partir de mexilhões, no Mar Adriático, na Itália, encontraram 32,2% de *V. alginolyticus* (20/30), seguida por 17,7% de *V. vulnificus* (11/30), 3,2% de *V. cincinnatiensis* (2/30) e 1,6% de *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* e *V. cholerae* não-O1 detectados em apenas 1 amostra cada.

Rodrigues et al. (2001) avaliaram lesões cutâneas em 50 pescadores da Praia da Raposa em decorrência das práticas pesqueiras e detectaram 21 indivíduos portadores de *Vibrio* spp. *Vibrio alginolyticus* foi o representante com maior frequência 66,6%, (14/21) seguido de *Vibrio parahaemolyticus* 42,8% (09/21) e de *Vibrio cholerae* não O1 9,5% (02/21). Dos 21 indivíduos portadores de *Vibrio*, 5 indivíduos apresentaram associação de espécie.

No trabalho desenvolvido por Pereira et al. (2007a) foi analisado um total de 50 amostras de moluscos bivalves marinhos (ostras e mexilhões) permitindo o isolamento de 141 cepas de *Vibrio parahaemolyticus*.

Além do monitoramento ambiental, deve-se atentar para o aspecto da questão relacionada à higiene alimentar. O risco do consumo de moluscos bivalves sem prévio cozimento pode resultar em infecções provocadas por diferentes microrganismos, particularmente aqueles pertencentes ao gênero *Vibrio*, e é agravado pelo fato de que a acidificação deste, pelo hábito da adição de limão, não parece interferir com a viabilidade da bactéria (VITELA; ESCARTIN 1993) Outro aspecto altamente relevante refere-se à manutenção de ostras e mexilhões por longos períodos sem refrigeração. A temperatura ambiente favorece a multiplicação em grande número de microrganismos, particularmente *V. parahaemolyticus*, que possui um tempo de geração curto, cerca de 10 minutos (OTWELL, 1997). O ideal é que os moluscos bivalves marinhos sejam conservados sob refrigeração (4°C) em ambiente limpo, sanitizado e cozidos por aproximadamente 30 minutos a fim de inativar possíveis patógenos bacterianos presentes. Ressalta-se a importância do cumprimento das regras básicas de higiene que auxiliam no combate a contaminação cruzada ou recontaminação do alimento pronto para consumo.

Pereira et al. (2007b) realizaram a análise microbiológica de 43 mexilhões *in natura* e 43 pré-cozidos e detectaram *Vibrio parahaemolyticus* neste tipo de alimento, o que constitui sérios riscos para a saúde do homem. Neste estudo, foram avaliadas 86 amostras, tendo sido detectadas 12 espécies diferentes de *Vibrio*. Nas amostras de mexilhões *in natura*, as espécies prevalentemente isoladas foram *Vibrio alginolyticus* 19% (26/86), *V. cholerae* não-O1 17% (23/43), *V. parahaemolyticus* 8% (11/43), *V. carchariae* 6% (8/43), *V. vulnificus* 4,4% (6/43) e *V. damsela* 4,4% (6/43). A partir dos mexilhões pré-cozidos foi verificado o isolamento de *V. cholerae* não-O1 17,3% (9/43), *V. vulnificus* 15,4% (8/43), *V. fluvialis* 13,5% (7/43), *V. parahaemolyticus* 11,5% (6/43), *V. alginolyticus* 9,6% (5/43) e *V. furnisii* 9,6% (5/43).

No presente estudo, a espécie *Vibrio fluvialis* também foi isolada (n=04) e dada a sua capacidade em ocasionar surtos esporádicos de gastroenterite após consumo de moluscos *in natura* (OLIVER; KAPER, 1997), pode representar risco aos próprios moradores da região, através do extrativismo para consumo próprio, ou ainda para o comércio destes animais como uma alternativa de subsistência. *Vibrio fluvialis* tem sido isolado em moluscos pesquisados

em regiões costeiras do Brasil. Barboni (2003) isolou 24 cepas de *V. fluvialis* ao avaliar 107 moluscos bivalves provenientes da Bahia de Todos os Santos, na Bahia, entre os anos de 2000 a 2002.

A presença de *V. vulnificus* nas amostras de mexilhões avaliadas (n=02) representa um importante achado microbiológico, visto que esta espécie possui elevado potencial patogênico para o homem podendo causar desde manifestações gastrointestinais, infecções extra-intestinais, até septicemia em indivíduos suscetíveis, em particular crianças, idosos e portadores de doenças crônico-degenerativas (NASCIMENTO et al., 2001). Nascimento et al. (2001) avaliaram a frequência de *V. vulnificus* em organismos marinhos e identificaram cepas de *Vibrio vulnificus* a partir de 20 amostras de camarão comercializado na feira de pescado do Mucuripe, Fortaleza. Dos 29 isolados, sete (35%) foram confirmadas como *Vibrio vulnificus*, significando alta percentagem de amostras contaminadas.

Destaca-se ainda que estudos ecológicos evidenciam a influência de fatores ambientais sobre a ocorrência de *Vibrio* spp. no ambiente aquático e sua associação com casos humanos (KOELLE et al., 2005). Recentemente foram descritos casos de infecção cutânea e gastroenterite causados por *Vibrio vulnificus*, após o desastre natural na passagem do furacão Katrina (MMWR, 2005). Essa característica revela a importância do monitoramento microbiológico do ecossistema marinho a fim de prevenir casos de infecção humana.

Apesar dos microrganismos da família Vibrionaceae e Aeromonadaceae serem considerados microrganismos com potencial patogênico a legislação brasileira não possui nenhum parâmetro que regule a presença de *V. vulnificus* e outras espécies de *Vibrio* em alimentos de origem marinha determinando condições de ausência aceitáveis. A legislação brasileira apenas condena a presença de *V. cholerae* e *Salmonella* spp. limitando a presença de *V. parahaemolyticus* em 10^5 UFC/g de alimento de origem marinha pronto para ser consumido. Em outros países prevê a ausência de *V. vulnificus* em alimentos e um limite aceitável de *V. parahaemolyticus* entre $10^2 - 10^3$ UFC/g de alimento (European Commission Health, 2001).

4.1.1.1 Perfil de suscetibilidade de *Vibrio* spp. isolados de mexilhões *Perna perna*

Em 51 isolados de *Vibrio* spp. avaliados foi detectado 100% de sensibilidade a tetraciclina, cloranfenicol, nitrofurantoína, pefloxacina, sulfametoxazol+trimetoprim e cefoxitina. No entanto, em relação a ampicilina não foi detectada sensibilidade, onde todos os isolados demonstraram resistência ao fármaco testado. Este fato pode estar relacionado com a troca de material genético entre bactérias presentes no ambiente aquático, em virtude das correntes marinhas.

Nossos resultados corroboram com Rodrigues et al. (2001) que avaliaram o perfil de suscetibilidade de 25 isolados de *Vibrio* spp. e detectaram 100% de sensibilidade ao cloranfenicol, 92% de sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina e 100% de resistência aos beta-lactâmicos.

Apesar da resistência antimicrobiana em *Vibrio* spp. ter sido detectada apenas a ampicilina, a presença de cepas de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos na aquicultura vem sendo relatada. Segundo Moriarty (1999), nas Filipinas uma enfermidade provocada por víbrios em 1996 no pescado provocou uma das maiores perdas econômicas da indústria no país. Os víbrios isolados mostraram-se resistentes ao cloranfenicol, furazolidonas, oxitetraciclinas e estreptomicinas.

Moriarty (2003) relata que a resistência antimicrobiana em fazendas de aquicultura tem ocorrido na Ásia e na América Latina, devido o uso de antibióticos como as fluoroquinolonas em larga quantidade na prevenção de infecções por *Vibrio* spp. O uso indiscriminado de antimicrobianos pode apresentar um impacto potencial para a saúde

humana uma vez que as bactérias presentes nos dejetos da fazenda podem se tornar resistentes e contaminar as águas costeiras.

Segundo Sotomayor; Balcázar (2003) a tendência atual é restringir ou reduzir o uso de antibióticos devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana, problemas ecológicos, restrições a importações pela presença de resíduos nos tecidos de mariscos e possíveis danos à saúde pública.

De acordo com dados presentes na literatura, apesar da elevada sensibilidade encontrada ao cloranfenicol em isolados de *Vibrio* spp. provenientes de fazendas de aquicultura deve-se ressaltar a intolerância de resíduos de cloranfenicol nos alimentos pela comunidade europeia, sendo a sua detecção considerada uma violação da lei, uma vez que a sua aplicação veterinária é ilegítima, apesar de não ser possível fazer a distinção do antibiótico que pode estar naturalmente presente no ambiente (contaminação pelo uso em humano), daquele utilizado em animais (HANEKAMP, 2003). Da mesma forma, há proibição de uso de nitrofuranoceos (furazolidona, nitrofurazona, nitrofurantoína e prenfurano) na aquicultura em todo mundo, sendo rejeitado e incinerado todo lote com resíduo, estando o país produtor sujeito a graves penalidades (KENNEDY et al., 2004).

4.1.2 Pesquisa de *Aeromonas* spp.

As bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídas no ambiente aquático, sendo atualmente, reconhecidas como organismos emergentes (CONWAY; ROPER, 2000; JOSEPH; CARNAHAN, 2000).

No presente estudo foram detectadas 03 colônias de *Aeromonas hydrophila*, referente a coleta do mês de maio de 2008. Estes microrganismos foram identificados apenas em nível de gênero devido às dificuldades encontradas para sua identificação. A literatura relata que as características bioquímicas deste gênero podem variar de acordo com a fonte de isolamento e com as características geográficas, favorecendo uma variabilidade de resultado, dificultando, portanto a classificação exata da espécie isolada (JOSEPH; CARNAHAN, 2000).

Segundo Rall et al. (1998), *Aeromonas* spp. não tem sido isolada com frequência de mexilhões. A reduzida incidência desta bactéria no presente estudo pode ser um reflexo do habitat dos mexilhões estudados. No entanto, resultados discordantes são demonstrados por Almeida; Nunes (1995) que relatam a presença de *Aeromonas* spp. associada a doenças em trutas e mexilhões criados em sistemas de aquicultura. Da mesma forma, Pereira et al. (2004b) ao avaliarem 86 amostras de mexilhões *Perna perna* detectaram a presença de *Aeromonas* em 74 (86%) das amostras. O fato de se isolar *Aeromonas* spp. a partir de moluscos sugere-se que o habitat dos mexilhões naquele dado momento constituía uma importante fonte de microrganismos deste gênero.

A capacidade de bactérias pertencentes a este gênero causarem infecções em diferentes espécies animais já está bem estabelecida e documentada na literatura. No entanto, seu potencial em causar doenças no homem, vem sendo estudada nas últimas décadas, mas só recentemente, um maior número de casos clínicos tem sido confirmados e associados a este microrganismo (VILA et al., 2002; CLARK; CHENOWETH, 2003).

Apesar do número reduzido de colônias de *Aeromonas* spp. existe a necessidade de se ampliar o conhecimento sobre este microrganismo, a fim de elucidar sua real importância para os campos da microbiologia e vigilância sanitária (VILLARI et al., 2003). A exposição de crianças, idosos e imunodeprimidos ao risco de infecção deve ser considerada como um problema de saúde pública, o qual necessita de prevenção sanitária e epidemiológica (PAVLOV et al., 2004).

4.1.3 Pesquisa de enterobactérias

A partir das análises bacteriológicas das três coletas efetuadas, foi obtido um total de 20 colônias de enterobactérias (gráfico 02) representadas por *Escherichia coli* (n=06), *Proteus vulgaris* (n=04), *Hafnia alvei* (n=02), *Serratia marcenscens* (n=02), *Yersinia enterocolitica* (n=02), *Citrobacter diversus* (n=01), *Citrobacter freundii* (n=01), *Enterobacter cloacae* (n=01) e *Enterobacter aerogens* (n=01). A tabela 02 mostra o número de espécies de enterobactérias isoladas em cada coleta.

Gráfico 02. Distribuição de enterobactérias isoladas.

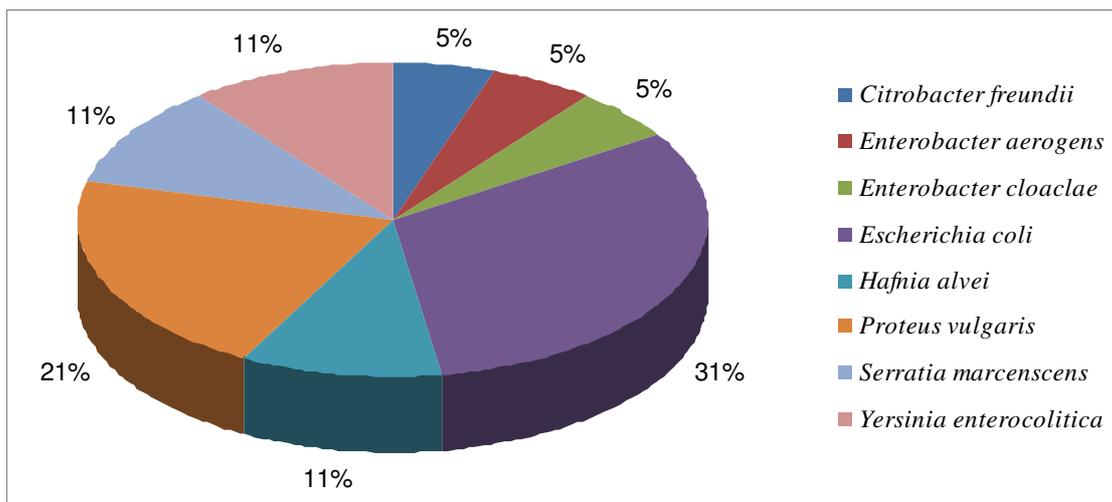


Tabela 03. Número de espécies de enterobactérias isoladas em cada coleta.

| Microrganismos Isolados | Número de Microrganismo Isolado | | |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------|
| | 1ª Coleta | 2ª Coleta | 3ª Coleta |
| <i>Citrobacter diversus</i> | 01 | - | - |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 01 | - | - |
| <i>Enterobacter aerogens</i> | - | - | 01 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 01 | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> | 02 | 02 | 02 |
| <i>Hafnia alvei</i> | - | - | 02 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 02 | 01 | 01 |
| <i>Serratia marcenscens</i> | 01 | 01 | - |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 01 | 01 | - |

Dentre os agentes bacterianos amplamente distribuídos no ecossistema aquático, destaca-se a família Enterobacteriaceae, cuja presença neste ambiente pode ser reconhecida através de sua detecção em moluscos bivalves, os quais têm sido utilizados como indicadores da qualidade sanitária das águas de cultivo ou da água do mar (LEHANE; RAWLIN 2000; HUBER et al., 2004).

A qualidade bacteriológica dos moluscos bivalves é controlada pela presença de bactérias que indicam especificamente a existência de contaminação fecal. Com a presença destes indicadores há a real possibilidade de microrganismos patogênicos com perigo potencial à saúde pública (SILVA et al., 2001; VIEIRA et al., 2004).

O meio urbano dá origem a várias impurezas, tais como poluentes atmosféricos carregados pela chuva, poeira e lixo, erosão do solo, uso de fertilizantes em jardins, além de ligações clandestinas de esgotos às galerias pluviais que favorecem a presença de microrganismos patogênicos. Esses poluentes caem em corpos d'água que, por sua vez, podem poluir criadouros nativos de moluscos ou seu habitat natural. Como esses animais são filtradores e bioacumuladores de microrganismos, sua microbiota está diretamente relacionada ao ambiente do qual eles se originam (ZAMARIOLI et al., 1997).

Os locais de lançamento de esgotos em lagoas, rios e áreas costeiras geralmente utilizadas como áreas recreacionais ou para aquicultura, constituem um potencial risco à saúde devido a maior oportunidade de se encontrar bactérias patogênicas veiculadas por meio do esgoto doméstico (QUENTIN, 1999). Este risco ambiental é potencializado quando cepas de enterobactérias com resistência a determinados antibióticos são transmitidos diretamente aos indivíduos e a outras bactérias, inclusive àquelas patogênicas causando riscos à saúde de banhistas ou pescadores que entram em contato com águas marinhas contendo estes microrganismos (HARWOOD, 2000). Além destes fatores, a ingestão de moluscos crus ou mal cozidos representa um risco à saúde do consumidor, uma vez que estes moluscos vivem geralmente em estuários e em áreas costeiras passíveis de poluição. A presença dos coliformes em moluscos indica que o alimento apresenta uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições sanitárias insatisfatórias, podendo causar quadros de gastroenterite (SILVA et al., 2004).

Escherichia coli é um dos patógenos de maior importância quando se deseja constatar contaminação por esgotos. Trata-se de um microrganismo presente na microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente sendo, portanto normalmente encontrado nas fezes (DIXIT et al., 2004).

Fernandez-Delgado et al. (2007) relata a presença de *Escherichia coli*, *Morganella morganii* e *Klebsiella pneumoniae* isolados a partir de ostras na região costeira da Nigéria. Além destes microrganismos o autor destaca a presença de *Proteus mirabilis*, o qual tem sido amplamente distribuído no ambiente, podendo contaminar a água e o solo. No ambiente marinho, *P. mirabilis* tem sido isolado de tecidos e fluidos de ostras, representando um risco potencial à saúde pública. Vieira et al. (2008) relatam o isolamento de *Escherichia coli* a partir de ostras cultivadas no rio Pacoti, Ceará.

Henriques (2001) identificou colônias de *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Vibrio* sp. e *Salmonella* sp. a partir de mexilhões proveniente de bancos naturais da Baixada Santista. Os resultados apontaram uma maior infestação no tecido mole dos animais do que na água do mar, demonstrando que os mexilhões são eficientes bioindicadores bacteriológicos.

O elevado isolamento de enterobactérias em mexilhões no Arquipélago de Santana ressalta a importância de um monitoramento ambiental. A presença de embarcações de suporte às plataformas petrolíferas nesta região e de aves marinhas liberando dejetos orgânicos na água do mar, bem como a lixiviação promovida pelas chuvas nas encostas do arquipélago podem explicar a presença destes microrganismos.

4.1.3.1 Pesquisa de *Salmonella*

A *Salmonella* é uma bactéria patogênica tanto ao homem quanto aos animais. Habita o trato intestinal de animais sendo, portanto eliminada através das fezes. Desta forma, pode contaminar a água, superfícies, alimentos e conseqüentemente os consumidores de alimentos (GERMANO, 2001; VIEIRA et al., 2004). Segundo a RDC nº 12 do Ministério da Saúde, a presença de *Salmonella* em 25 g da amostra indica a inadequação do produto para o consumo, constituindo um sério problema para a saúde pública (ANVISA, 2001). No presente estudo não foi detectado a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das coletas realizadas. Estes resultados corroboram com trabalho desenvolvido por Henriques et al. (2006) que ao

avaliarem 50 mexilhões coletados da Ilha de Urubuqueçaba, estado de São Paulo, não detectaram a presença de *Salmonella* em nenhum dos mexilhões coletados. Da mesma forma Castro et al. (2003) não detectaram a presença de *Salmonella* ao avaliar 100 amostras de pescado. Feldhusen (2000) relata a baixa incidência de salmonelose em humanos causadas pelo consumo de crustáceos, peixes e moluscos na Europa e América do Norte quando comparados com outros alimentos. Segundo Germano et al. (1993) os resultados negativos para este microrganismo pode estar associado a sua estreita sobrevida na água do mar. A veiculação hídrica deste microrganismo é restrita a poucos relatos e a falta de saneamento. No entanto, a literatura relata casos de salmonelose associados ao consumo de organismos de origem marinha e vegetais crus (HUSS et al., 2000; SILVA et al., 2000). Lipp; Rose (1997) alertam para o risco que este patógeno representa para indivíduos imunocomprometidos e salientam a importância da cocção de alimentos marinhos para a eliminação deste patógeno, visto este microrganismos ser resistente a baixas temperaturas.

4.1.3.2 Perfil de suscetibilidade de enterobactérias isoladas de mexilhões *Perna perna*

Em 20 isolados de enterobactérias avaliados foi detectado 100% de sensibilidade a levofloxacina e ciprofloxacina, 95% de sensibilidade ao imipinim e a norfloxacina e 90% de sensibilidade a cefoxitina e ao sulfametoxazol-trimetropim.

Vieira et al. (2008) avaliaram o perfil de suscetibilidade de 25 isolados de *Escherichia coli* provenientes do líquido intravalvar de ostras e detectaram os seguintes percentuais de sensibilidade: 92% de sensibilidade a ciprofloxacina, 84% a nitrofurantoína, 76% ao sulfametoxazol-trimetropim, 40% a tetraciclina e 32% a ampicilina.

Cardonha et al. (2004) em três praias de Natal detectou cepas de *E. coli*, isoladas da água do mar sensíveis a ciprofloxacina e imipinim. Da mesma forma Vasconcelos (2005), ao avaliar o perfil de suscetibilidade de microrganismos presentes em duas praias de Fortaleza, isolou cepas de *E. coli* que também foram 100% sensíveis a estes antimicrobianos. Barros et al. (2005) também relatam a sensibilidade de enterobactérias isoladas de ostras no Ceará ao avaliar a suscetibilidade a tetraciclina e cloranfenicol.

4.2 Pesquisa de Coliformes Totais e Termotolerantes da Água do Mar

A pesquisa do grupo dos coliformes termotolerantes é tradicionalmente empregada, sobretudo em saúde pública, como indicador das condições higiênico-sanitárias de uma amostra. A presença deste é um indicativo de contaminação fecal (WEBSTER et al., 2004). De um total de seis amostras analisadas não foram detectadas a presença de coliformes totais e termotolerantes em nenhuma das amostras. Este resultado possivelmente está relacionado ao fato do local de coleta ser distante da costa e estar sobre área de proteção ambiental. As condições sanitárias dos mexilhões são altamente correlacionadas com os níveis de contaminação da água onde eles são encontrados. A poluição dos ambientes marinhos tem comprometido a qualidade e a segurança de vários produtos alimentícios obtidos de mares cujas águas estão contaminadas (FURLAN, 2004).

Furlan (2004) detectou coliformes totais e termotolerantes ao avaliar a água de cultivo de mexilhões no litoral de São Paulo. Da mesma forma Galvão et al. (2004) detectaram coliformes totais e termotolerantes na água de cultivo de mexilhões em Ubatuba – SP, demonstrando a importância da dinâmica populacional humana sobre este parâmetro.

4 CONCLUSÕES

- A associação entre humanos, ambientes aquáticos e microrganismos aponta para a importância de um monitoramento ambiental responsável, através de uma sistemática de controle das cepas circulantes e seus possíveis potenciais patogênicos e significados clínicos. O baixo percentual de microrganismos isolados de mexilhões no Arquipélago de Santana pode ser justificado por ser um local de mar aberto, afastado da costa e sobre a influência de correntes marítimas, e ainda pouco impactado pela ação humana.

- Ao avaliarmos o perfil de contaminação microbiana encontrado no Arquipélago de Santana é possível inferir que a instalação de cultivos de mexilhões em áreas abrigadas mais afastadas da costa e com uma maior profundidade pode se constituir num ambiente propício à maricultura.

- Dentre os microrganismos isolados no presente trabalho, aqueles que apresentam maior importância para a saúde pública, dada sua patogenicidade para população humana, são *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *Aeromonas hydrophila*.

- *Vibrio alginolyticus* foi a espécie mais prevalente isolada a partir de mexilhões. Este patógeno possui importância relacionada ao manuseio dos mexilhões, uma vez que as valvas destes moluscos podem ocasionar ferimentos durante sua manipulação, acarretando problemas aos maricultores e catadores de mexilhões.

- Foi identificadas espécies de *Vibrio*, que embora apresente baixa patogenicidade para humanos são de grande importância econômica para a aquicultura por sua alta patogenicidade para pescados e moluscos, como *Vibrio anguillarum*, *V. harveyi*.

- Os resultados obtidos no presente trabalho apontam para o risco relacionado ao consumo de mexilhões sem prévio cozimento, o que pode resultar em infecção humana caracterizada por manifestações gastrointestinais.

- Apesar da baixa incidência de isolados do gênero *Aeromonas* é importante ressaltar que este microrganismo constitui riscos para o homem, pois esta bactéria está associada ao surgimento de gastroenterites sob a forma de surtos e também outras infecções extraintestinais.

- Os isolados de *Vibrio* spp se apresentaram sensíveis aos antimicrobianos testados, com exceção da penicilina onde detectou-se 100% de resistência.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.W.; JANDA, J.M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal Clinical Microbiology**, v.4, n.6, p. 2348-57, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 de janeiro de 2001. n.7, seção 1, p. 45-53, 2001.

ARANA, L.V. Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para a formulação de políticas públicas de desenvolvimento da aquicultura brasileira. **UFSC**, Florianópolis, SC, 1999.

BALEBONA, M. C., ANDREU, M. J., BORDAS, M. A., ZORRILLA, I., MORIÑIGO, M. A., BORREGO, J.J. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for culture gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.11, p. 4269-4275, 1998.

BAFFONE, W.; PIANETTI, A.; BRUSCOLINI, F.; BARBIERI, E.; CITTERIO, B. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. **International Journal of Food Microbiology**, v.54, p.9-18, 2000.

BARBONI, S.A.V. Ocorrência de *Vibrio* spp potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados nos anos 2000 a 2002 nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia-Brasil. Doutorado em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2003.

BASTOS, R. K. S. Coliformes como indicadores da qualidade da água: alcance e limitações. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 27., 2000, Porto Alegre. **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, p. 1-11, 2000.

BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.M. Processamento e industrialização de moluscos. **Tecnologias para o aproveitamento legal do pescado**, Campinas p.38-84, 2000.

BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M. Processamento e industrialização de moluscos. In: Seminário e workshop tecnologias para aproveitamento integral do pescado. Campinas. **Anais**. p. 38-84. 2000.

BELTRÃO, M. Arqueologia do Estado do Rio de Janeiro, Arquivo Público do Rio de Janeiro, 1995.

BERRE, J.-C. L. Promesses de l'aquaculture. **Le Monde Diplomatique**, p. 15,1995.

BHUIYAN, N. A., ANSARUZZAMAN, M., KAMRUZZAMAN, M., ALAM, K., CHOWDHURY, N. R., NISHIBUCHI, M., FARUQUE, S. M., SACH, D.A., TAKEDA, Y., NAIR, G. B. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.1, p. 284-286, 2001.

BLAKE PA. Epidemiology of cholera in the Americas. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.22, p. 639-660, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 10 jan.

BUTT, A. A.; ALDRIDGE, K. E.; SANDERS A.C.V. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases** v.4, n. 4, p.201-212, 2004.

BRAVO, L. MONTÉ, R., SILVA, M., RAMIREZ, M, GARCIA, B., FERNANDEZ, A., ROSSOLINI, G., GUGGLIELMETTI, P. Acute diarrhea associated with heat stable enterotoxin producing strains of *Vibrio cholerae* non O1: First report from Cuba. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.255-256, 1998.

BRYAN, P.J., STEFFAN, R.J., DePAOLA, A., FOSTER, J.W., BEJ, A.K. Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. **Current Microbiology**, v.38, p.168-175, 1999.

CABRERA-GARCIA, M. E.; VASQUEZ-SALINAS, C.; QUINONES-RAMIREZ, E. I. Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of Gulf of Mexico. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, n.11, p.6401-6406, 2004.

CALIF, E., PICK, N., DREYFUSS, U., STAHI, S. Upper extremity infections following common carp fish (*Cyprinus carpio*) handling. **Journal of Hand Surgery**, 27B: v.1, p.78-82, 2002.

CARNAHAN, A.M.; HARDING, J. WASTKY, D.; HANSMAN, S. Identification of *Vibrio hollisae* associated with severe gastroenteritis after consumption of raw oysters. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1805-1806, 1994.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUEIRAS, M.J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNÁNDEZ- RENDÓN, E.; APARICIO, G.O.; GUARRO, J.; CHACÓN, M.R. Characterisation of *Aeromonas spp.* isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.41-49, 2003.

CARDONHA, A. M. S. Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. **International Microbiology**, v.7, n.3, p.213-218, 2004.

CASTRO, M.R.S.; FREIRE, I.G.M.; ESCOBAR, C.A.M.; ANTUNES, G.M.; FARO, Z.P. Influência da contaminação ambiental nas condições higiênico-sanitária do peixe Curimã oriundo da favela do Caranguejo, Recife, PE. **Higiene Alimentar**, v.17, p.54-61, 2003.

- CAVALLO, R.A., STABILI, L. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). **Water Research**, v.36, p.3719-26, 2002.
- CERDÀ-CUÉLLAR, M.; PERMIN, L.; LARSEN, J. L.; BLANCH, A. R. Comparison of selective media for the detection of *Vibrio vulnificus* in environmental samples. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.322-327, 2001.
- CHAKRABORTY, S.; NAIR, G.B.; SHINODA, S. Pathogenic vibrios in the natural aquaculture environment. **Review in Environmental Health**, v.12, p.63-80, 1997.
- CHIEN, J.Y.; SHIH, J.T.H.; SUEH, P.R.; YANG, P.C.; LUH, K.T. *Vibrio alginolyticus* as the cause of pleural empyema and bacteremia in an immunocompromised patient. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.21, p.401-403, 2002.
- CLARK, N.M.; CHENOWETH, C.E. *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature. **Clinical Infectious Disease**, v.37, p.506-513, 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 2005.
- COLWELL, R.R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. **Science**, v.274, p.2025-31, 1996.
- CONWAY, D.J.; ROPER, C. Micro-evolution and emergence of pathogens. **International Journal for Parasitology**, v.30; p.1423-1430, 2000.
- COOK, D.W. Refrigeration of oyster shellstock conditions which minimize the outgrowth of *Vibrio vulnificus*. **Journal of Food Protection**, v.60, p.349-352, 1997.
- COOK, D. W. Molluscan, shellfish: oysters, mussels and clams. In DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: **APHA**, p.507- 514, 2001.
- DANIELS, N.A.; RAY, B.; EASTON, A.; MARANO, N.; KAHN, E.; MCSHAN, A.L.; DEL ROSARIO, L.; BALDWIN, T.; KINGSLEY, M.A.; PUHR, N.D.; WELLS, J.G.; ANGULO, F.J. *Vibrio vulnificus* and a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters. **JAMA**, v.284, n.12, p.1541-45, 2000.
- DEPAOLA, A.; MCLEROY, S.; MCMANUS, G. Distribution of *Vibrio vulnificus* phage in oyster tissues and other estuarine habitats. **Journal of Food Protection**, v.63; p.2464-2467, 1997.
- DENKIN, S. M.; NELSON, D. R. Regulation of *Vibrio anguillarum empA* metalloprotease expression and its role in virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.4193-4204, 2004.

DIXIT, S.M.; GORDON, D.M.; WU, X.Y.; CAPMAN, T.; KAILASAPATHY, K.; CHIN, J.J.C. Diversity analysis of commensal porcine *Escherichia coli* – associations between genotypes and habitat in the porcine gastrointestinal tract. **Microbiology**, v.150, p.1735-1740, 2004.

DUYLVY, N.K.; SADOVY, Y.; REYNOLDS, J.D. Extinction vulnerability in marine populations. **Rev Fisher and Fisheries**, v.4, p.25-64, 2003.

European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on *Vibrio*. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General Directorate B - Scientific Health Opinions Unit B3 - Management of scientific committees II23 September 2001.

FAMASC, Maricultura em Santa Catarina. 2002. Disponível em <http://www.bsi.com.br/unilivre/centro/experiencias/experiencias/405.html>. Acesso em: 30/08/2008.

FDA, Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* spp. 1995. Disponível em (<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>). Acesso em 30/08/2008.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborn diseases. **Microbes and Infection**, v.2, p.1651-1660, 2000.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. In: **FDA bacteriological analytical manual online, sep.** 2002. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebem/bam-4a.html>> Acesso em 28 julho 2008.

FERNANDEZ-DELGADO, M.; CONTRERAS, M.; GARCIA-AMADO, M.A.; GUENEAU, P.; SUAREZ, P. Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of venezuelan oysters. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.49; n.6, p.355-359, 2007.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M., Cultivo de mexilhões em Santa Catarina. **Panorama da Aqüicultura**, v.14, p.10-11, 1992.

FIPERJ – Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em www.fiperj.rj.gov.br. Acesso em 05/08/2008.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: **Artmed**, 2002. 424p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; GELLI, D. S. Foodborne diseases in Southern South America. In: MILLIOTIS, M. D.; BIER, J. W. **International Handbook of Foodborne Pathogens**. Marcel Dekker, New York, p. 733-743, 2003.

FREITAS, M.. Incrustações biológicas no mexilhão *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia), cultivado na Ilha de Ratonés, SC: Efeito da exposição ao ar. Santa Catarina, Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, (1997), 231p.

FUJINO, T.; SAKAZAKI, R.; TAMURA, K. Designation of the type strains of *Vibrio parahaemolyticus* and description of 200 strains of the species. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.24, p.447–449, 1974.

FURLAN, E.F. Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Piracicaba, 2004, 108 p. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo.

GALVÃO, J.A. Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP. Dissertação (Mestrado) 2004. 109P. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) – Universidade de São Paulo.

GARTHRIGHT, W. E. Appendix 2: most probable number from serial dilutions, In: **FDA bacteriological analytical manual online**, 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html> Acesso em: 10 junho 2008.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo: **Varela**, 2001.

GIBOTTI, A.; SARADAKIS, H.O.; PELAYO, J.S.; TAGLIARI, K.C.; FALCÃO, D.P. Prevalence an virulence properties of *Vibrio cholera* non-01, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). *Journal Applied Microbiology*, v.89, p.70-75, 2000.

GLASS, R.I.; CLAESON. M.; BLAKE, P. Cholera in Africa: Lessons on Transmission and Control for Latin America. **The Lancet**, v.338, n.877, p.791-795, 1991.

GONZALEZ, E.N.; CACHICAR, V.; ACEVEDO, C.; RIOSECO, M.L.; VERGARA, J.A.; CABELLO, F.; ROMERO, J.; ESPEJO, R.T. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. **Emerging Infectious Disease**, 2003, v.11, p.129-131, 2005.

GOTTING, K.J. Malakozologie. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, (1974), 320p.

GRANUM, P.E.; O’SULLIVAN, K.; TOMÁS, J.M.; ORMEN, O. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v21, p.131-37, 1998.

HANEKAMP, J.C.; BERGKAMP, L. Reach y el principio precautorio: costos y beneficios de la legislación propuesta por la EU. Disponível http://www.policynetwork.net/uploaded/pdf/cap8-salud_medioambiente.pdf. Acesso em 16/08/2008.

HARF-MONTEIL, C.; FLÈCHE, A.L.; RIEGEL, P.; PRÉVOST, G.; BERMOND, D.; GRIMONT, P.A.D.; MONTEIL, H. *Aeromonas simiae* sp. Nov., isolated from monkey faeces. **International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.481-485, 2004.

HARWOOD, J. V.; WHITLOCK; WITHINGTON, V. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n. 9, p. 3698-3704, 2000.

HARWOOD, V. J.; GANDHI, J. P. & WRIGHT, A. C. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. **Journal Microbiology Methods**, v.59, n.3, p.301-316, 2004.

HAYAT MAHMUD, Z. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel Japan. **Microbiological Research**, v.161, n.1, p.25-37, 2006.

HEELAY, J.S. A fatal case of *Vibrio vulnificus* infection in an alcoholic male. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.23, p.18, 2002.

HEIDELBERG, J.F.; HEIDELBERG, K.B.; COLWELL, R.R. Bacteria of the gamma-subclass Proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake Bay. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.5498-507, 2002.

HEITMANN, I.G.; JOFRE, L.M.; HORMAZABAL, O.J.C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Revista Chilena de Infectologia**, v.22, p.131-140, 2005.

HENRIQUES, M.B.; PEREIRA, O.M.; ZAMARIOLLI, L.A.; FAUSTINO, J.S. Contaminação bacteriológica no tecido mole do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) coletado nos bancos naturais do litoral da Baixada Santista. **Arquivos de Ciências do Mar, UFCE – LABOMAR, Fortaleza**, v.33, p.69-76, 2000.

HENRIQUES, M. B. Avaliação dos bancos naturais do mexilhão *Perna perna* (L., 1758) na baía de Santos, Estado de São Paulo. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2001.

HENRIQUES, M.B.; MARQUES, H.L.A.; PEREIRA, O.M.; LOMBARDI, J.V. Resistência do mexilhão *Perna perna* a baixas salinidades e sua relação com a contaminação bacteriológica. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, v.32, n.2, p. 107 - 114, 2006.

HØI, L.; LARSEN, J.; DALSGAARD, L. I., DALSGAARD, A.. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p.7-13, 1998.

HOLLIS, D.G.; WEAVER, R.E.; BAKER, C.N.; THORNSBERRY, C. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. **Journal Clinical Microbiology**, v.3, n.4, p. 425-431, 1976.

HONDA, T.; LAPUEBLA, M.A.A.; NI, Y.; YAMAMOTO, K. Characterization of a new thermostable direct haemolysin produced by Kanagawa-phenomenon negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Gen. Microb.**, v.137, n.2, p.253-9, 1991.

HÖRMANSDORFER, S.; WENTGES, H.; NEUGEBAUR-BÜCHER, K.; BAUER, J. Isolation of *Vibrio alginoliticus* from seawater aquaria. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v.203, p.169-175, 2000.

HORRÉ, R.; MARKLEIN, G. SCHAAL, K.P. *Vibrio vulnificus*, an emerging human pathogen. **Bacteriology**, v.28, p.273-284, 1996.

HUANG, K.C.; HSU, R.W.W. *Vibrio fluvialis* hemorrhagic cellulitid and cerebritis. **Clinical Infectious Diseases**, v.40, p.75-77, 2005.

HUBER, I.; SPANGGAARD, B.; APPEL, K.F.; ROSSEN, L.; NIELSENAND, T.; GRAM, L. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal Applied Microbiology**, v.96, n.117, 2004.

HUSS, H.H.; ABABOUCHE L.; GRAM, L. Assessment and management of seafood safety and quality. Fisheries technical paper N°44. **Food and Agriculture Organization of the United Nation** (FAO), Rome, 2004.

JAKSIĆ, S.; UHITIL,S.; PETRAK, T.; BAZULIC, D.; KAROLYI, L.G. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. **Food Control**, v.13, p.491-93, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artemed, 2005.

JOSEPH, S.W.; CARNAHAN, A.M.; BRAYTON, P.R.; FANNING, G.R.; ALMAZAN, R.; DRABICK, C.; TRUDO, J.; COLWELL, R.R. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.565-569, 2000.

KENNEDY, D. G. Nitrofurans in Poultry. S.A.M.P.C.A. meeting, Fatima (May, 21) (*personal communication*), 2003.

KINGOMBE, C.I.B.; HUYS, G, HOWALD D,LUTHI E, SWINGS J, JEMMIT. The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas spp.* Harboring virulence markers in foods. **International Journal of Microbiology**, v.94, p.113-121, 2004.

KIRKAN, S.; GÖKSOY, E.Ö.; KAYA, O. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in turkey hatchery farms. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v.50, n.7, p. 339-42. 2003.

KOELLE, K.; PASCUAL, M.; YUNUS, M. Pathogen adaptation to seasonal forcing and climate change. **Proc. Biol. Sci.**, v.272, n.1566, p.971-977, 2005.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. **Diagnóstico Microbiológico**, 5.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2001.

KÜPLÜLÜ, Ö.; GÖNCÜOĞLU, M.; ÖZDEMİR, H.; KOLUMAN, A.. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. **Food Control**, v.17, p.222-224, 2006.

- LAI, C.H.; HWANG, C.K.; CHIN, C.; LIN, H.H.; WONG, W.W.; LIU, C.Y. Severe watery diarrhea and bacteraemia caused by *Vibrio fluvialis*. **Journal of Infection**. v.52, n.95-98, 2006.
- LEHANE, L.; RAWLIN, G.T. Tropically acquired bacterial zoonoses from fish: a review. **Med. J. Aust**, v.173, n.256-259, 2000.
- LEE, K. K.; LIU, P. C.; CHUANG, W. H. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. **Mar. Biotechnol.**, v.4, n.3, p. 267-277, 2002.
- LESMANA, M.; SUBEKTI, D.S.; TJANIADI, P.; SIMANJUNTAK, C.H.; PEENJALOI, N.H.; CAMPBELL, J.R.; OYOJO, B.A. Spectrum of vibrio species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.43, n.91-97, 2002.
- LIGHTNER, D. V. Disease of culture penaeid shrimp. In: **Handbook of Mariculture Crustacean Aquaculture**, CRC Press, Boca Ráton, 1996.
- LINDNER, G. **Moluscos y caracoles de los mares del mundo**. Aspecto/Distribución/Sistemática. Tercera edición. Barcelona: Ed. Omega, S.A., (1989), 236p.
- LIRA, A. *Vibrio Parahaemolyticus* em bivalves comercializados no Grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, v.15, n.90, p.91, 2001.
- LIPP, E.K.; ROSE, J.B. The role of seafood in foodborne diseases in the USA. Contamination of Animal Products: Prevention and Risks for Public Health. **Office International des Epizooties Review**, v.16, n.2, p.620-640, 1997.
- LLEÒ, M.M. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but nonculturable state. **Journal of Applied Microbiology**. v.91, n.6, p.1095-1102, 2001.
- LOPES, C. M.; RABADAO, E. M.; VENTURA, C.; CUNHA, S. da; CORTE, R. R. MELICO, A. A. S. A case of *Vibrio alginolyticus* bacteremia and probable sphenoiditis following a dive in the sea. **Clinical Infectious Diseases**, v.17, p.299-300, 1993.
- LUNETTA, J.E. Fisiologia da Reprodução dos Mexilhões (*Mytilus perna* – Mollusca Lamellibranchia). Bolm. Fac. Filos. Cienc. Univ. S. Paulo, Zool. Biol. Mar., n.s., 26: 33-111., 1969
- MAGALHÃES, V.; CASTELLO, A. F.; MAGALHÃES, M.; GOMES, T. T. Laboratory evaluation on pathogenic potentialities of *Vibrio furnissii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p.593-97, 1996.
- MARQUES, H.L.A. Considerações ecológicas sobre o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) em bancos naturais da região de Ubatuba, São Paulo, Brasil. Campinas, Dissertação (Mestrado em Ecologia), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, (1988), 108p.

MARQUES, H.L.A.; LIMA, PEREIRA, R.T.; CORREA, B.C. Seasonal variation in growth and yield of the brown mussel *Perna perna* (L.) cultured in Ubatuba, Brazil. **Aquaculture**, v.169, n. 263-73, 1998.

MATSUMOTO, C.; OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; IWANAGA, M.; GARG, P.; RAMAMURTHY, T.; WONG, H.C.; DEPAOLA, A.; KIM, Y.B.; ALBERT, M.J.; NISHIBUCHI, M. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analysis. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, p.578-585, 2000.

MATTÉ MH. Aplicação de Métodos Moleculares no Estudo de Organismos de Gênero *Aeromonas*. São Paulo, 2004. Tese de Livre-Dôcência – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/ USP.

MATTICK, K.L.; DONOVAN, T.J. The risk to public health of *Aeromonas* in ready-to eat salad products. **Communicable Disease Public Health**, v.1, p.267-70, 1998.

MAUGERI, T.L.; CACCAMO, D.; GUGLIANDOLO, C. Potentially pathogenic *Vibrios* in brackish waters and mussels. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.261-246, 2000.

MENDES, E.S.; ALVES, C.A.B.; BEZERRA, S.S.; MENDES, P.P.; SANTOS, F.L. Sazonalidade dos microrganismos em ostras consumidas na grande recife, PE.. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.116-117, p.79-87, 2004.

MIYOSHI, S.; HIRATA, Y.; TOMOCHIKA, K.; SHINODA, S. *Vibrio vulnificus* may produce a metalloprotease causing an edematous skin lesion in vivo. **FEMS Microbiology Letters**, v.121, p.321-326, 1994

MONETTO, A.M.; FRANCAVILLA, A.; RONDINI, A.; MANCA, L.; SIRAVEGNA, M.; FERNANDEZ, R. A study of botulinum spores. **Anaerobe**, v.5, p. 185-186, 1999. Narkevich MI, Onischenko GG, Lomov JM. The Seventh Pandemic of Cholera in the USSR, 1961-89. **Bulletin of the World Health Organization**, v.71, n.2, p.189-196, 1999.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT (MMWR)- *Vibrio* Illnesses after Hurricane Katrina–Multiple States, August-September 2005. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5437a5.htm> Acesso em 1/10/2008.

MORELLI, A. M. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; REIS, C. M. F.; RODRIGUES, D. P.; FONTELES-FILHO, A. A. Indicadores de contaminação fecal para ostra-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. **Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p.81-88, 2003.

MORENO, M. L. G.; LANDGRAF, M. Virulence factors and pathogenicity of *Vibrio vulnificus* strains from seafood. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, n.747-751, 1998.

MORIARTY, D. J. W. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial interactions in aquaculture. **Atlantic Canadian Society for Microbial Ecology**, Halifax, Canada. v.5, p.237-243, 1999.

MORIARTY, D. J. W. Os perigos do uso de antibióticos na aquicultura. 2003. Disponível em: <<http://www.aqualider.com.br/article.php>>. Acesso em: 08/07/2008.

NAKAGUCHI, Y.; OKUDA, J.; IIDA, T.; NISHIBUSCHI, M. The urease gene cluster of *Vibrio parahaemolyticus* does not influence the expression of thermostable direct hemolysin (TDH) gene or the TDH related hemolysin gene. **Microbiology of Immunology**, v.47, p.233-239, 2003.

NARCKEVICH, M.I.; ONISCHENKO, G.G.; LOMOV, J.M. The Seventh Pandemic of Cholera in the USSR, 1961-89. **Bulletin of the World Health Organization**, v.71, n.2, p.189-196, 1993.

NASCIMENTO, S.M.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; THEOPHILO, G.N.D.; RODRIGUES, D.P.; VIEIRA, G.H.F. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.43, p.263-266, 2001.

NICOLAS, J.L.; BASUYAX, O.; MAZURIE, J.; THEBAULT, A. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. **Diseases Aquatic Organisms**, v.50, p.35-43, 2002.

NISHIKAWA, Y.; KISHI, T. Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. **Epidemiology and Infection**, v.101, p.213-23, 1998.

OLIVER, D.O.; KAPER, J. B. *Vibrio* species. In: Oliver & Kaper, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T.J. Editors. **Food Microbiology**. Fundamentals and Frontiers American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 228-264, 1997.

OMS, 2001. Estratégia mundial de la oms para contener la resistência a los antimicrobianos, Geneve, OMS.

ØRME, Ø.; GRANUM, P.E.; LASSEN, J.; FIGUEIRAS, M.J. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas spp.* **APMIS**, v.113, p.203-207, 2005.

OTWELL, W.S. Ready to eat Seafoods. Important Food Safety Considerations. <http://vm.cfsan.fda.gov/~ear/FLRTESEA.html>, acesso em 03/09/2007.

PAULY D.; WATSON R. Contando os últimos peixes. Disponível em <<http://www2.uol.com.br/sciam/>>. Acesso em: 09/09/2008.

PAVLOV, D.; WET, C.M.; GRABOW, W.O.; EHLERS, M.M. Potentially pathogenic features of hetero trophic plate count bacteria isolate from treated and untreated drinking water. **International Journal Food microbial**. v.92, n.3, p.275-87, 2004.

PEREIRA, C.S.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.24 n.4 2004 (a).

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Aeromonas spp.* e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*perna perna*) *in natura* e pré-cozidos no rio de janeiro, RJ. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.4, p.562-566, 2004 (b).

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

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.1, p.56-59, 2007 (b).

PFEFFER, C. S.; HITE, F. M.; OLIVER, J. D. Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of Eastern North Carolina. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n. 6, p.3526-3531, 2003.

PIANETTI, A.; FALCIONI, T.; BRUSCOLINI, F.; SABATINI, L.; SISTI, E.; PAPA, S. Determination of the viability of *Aeromonas hydrophila* in different types of water by flow cytometry, and comparison with classical methods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n.12, p.7948-54, 2005.

QUENTIN, C.; GONI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, P. C. Impact of an Urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n.1, p.125-132, 1999.

RALL, V.L.M.; BOMBO, A.J.; LOPES, T.F.; CARVALHO, L.R.; SILVA, M.G. Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health? **Anaerobe**, v.9, p. 299-303, 2003.

RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: **Bacteriological Analytical Manual**, 8ª ed., Cap.14, 2001. (Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html> / Acesso em: 06/07/2008).

RIPABELLE, G.; SAMMARCO, M.L.; GRASSO, G.M.; FANELLI, I.; CAPRIOLI, A.; LUZZI, I. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in mussels harvested from Adriatic sea. **International Journal of Food Microbiology**, v.49, p.43-46, 1999.

RIPPEY, S.R. Infectious disease associated with molluscan shellfish consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, p.419-425, 1994.

RODRIGUES, P.F. Caracterização sanitária de águas de criação de moluscos bivalves do litoral norte do Estado de São Paulo. São Paulo, 1998, 66p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

RODRIGUES, S. M. A.; GONÇALVES, E. G. R.; MELLO, D. M.; HOFER, E. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.34, n.5, p.407-411, 2001.

RODRIGUES, L.K.; MOREIRA, A.M.; ALMEIDA, A.T.S.; RODRIGUES, M.J. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Revista Ciência Rural**, v.34, p.297-299, 2004.

SACK, D. A.; SACK, R. B.; NAIR, G. B.; SIDDIQUE, A. K. Cholera. **Lancet**, v.363, p.223–233, 2004.

SCOGLIO, M.E.; DiPIETRO, A.; PICERNO, F.; DELIA, S.; MAURO, A.; LAGANA, P. Virulence factors in vibrios and aeromonads isolated from seafood. **New Microbiology**, v.24, p.273-80, 2001.

SAKAI, H. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p.5739-5744, 2004.

SAKAZAKI, R.; IWANAMI, S.; FUKUMI, H. Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v.16, p.161-88, 1963.

SEN, K.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **Journal Applied Microbiology**, v.97, n.5, p.1077-86, 2004.

SILVA, N da, NETO, R.C.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.S.A. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. Campinas: ITAL, 2000. 99p.

SILVA, H. A.; SILVA, M.L.; FERREIRA, A. M.; MAGALHÃES, N.; ALBUQUERQUE, M. M., 2001. **Methodology evaluation for detection of *Salmonella* in bivalve molluscs from highly contaminated waters**. 31st WEFTA meeting. May 21- 31 2001. Espoo, Finland.

SILVA, A. I. M. Bacteria of fecal origin, in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Cocó River estuary, Ceará State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.1-2, p.126-130, 2004.

SODRÉ, F.N.G. dos S. Avaliação da qualidade ambiental e crescimento do mexilhão *Perna perna* no parque de cultivo de moluscos bivalves de Guaibura, Guarapari. Guarapari, Universidade Federal do Espírito Santo, **Monografia de Especialização em Ecologia e Recursos Naturais**, 2001.

SOLOMON, H.M.; LILLY, T. *Clostridium botulinum*. In: Bacteriological Analytical Manual, 8^a ed., Cap. 17, 2001. (Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-17.html> / Acesso em: 06/07/2008).

SOTOMAYOR, M. A.; BALCÁZAR, J. L. Inibição de vibrios patogênicos de camarão por mezclas de cepas probióticas. **Revista Aquatic**, n.19, p.9-15, 2003.

SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.F.; MENEZES, F.G.R.; REIS, C.M.F.; HOFER, E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó River Estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v.46, n.2, p.59-62, 2004.

SOUZA, R.C.C.L. Bivalves marinhos introduzidos no Brasil. Resumos do XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia, Rio de Janeiro, Resumos do XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia, 2003.

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

SZCZUKA, E.; KAZNOWSKI, A. Typing of Clinical and environmental *Aeromonas sp.* Strains by Random amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus Sequence PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.220-228, 2004.

TAMPLIN, M.L. Coastal vibrios: identifying relationships between environmental condition and human disease. **Human and Ecological Risk Assessment**, v.7, p.1437-1445, 2001.

TANG, W.M.; WONG, J. Necrotizing fasciitis caused by *Vibrio damsela*. **Orthopedics**, v.22, p.443-444, 1999.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.31-41, 2002.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.68, p.403-431, 2004.

TOLEDO LM. O cólera nas Américas e sua produção no Brasil. **Informe Epidemiológico do SUS**, II(1): 08-38, 1993.

VARGHESE, M.R.; FAR, R.W.; WAX, M.K.; CHAJIN, B.J.; OWENA, R.M. *Vibrio fluvialis* wound infection associated with medicinal leech therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p.709-10, 1996.

VASCONCELOS, R.H. Balneabilidade das praias de Iracema e Náutico (Fortaleza – Ceará) e pesquisa de cepas de *Escherichia coli* patogênicas em suas águas. 2005. 31 f. Monografia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

VENIERI, D.; VANTARAKIS, A.; KOMNINO, G.; PAPAPETROPOULOU, M. Microbiological evaluation of bottled non- carbonated (“still”) water from domestic brands in Greece. **International Journal food Microbiology**, v.107, n.1, p. 68-72, 2006.

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

VIEIRA, R. H. F.; GESTEIRA, T. C. V.; MARQUES, L. C; MARTINS, P. C. C.; MONTEIRO, C. M. & CARVALHO, R. L. *Vibrio* spp. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 33, p. 107 – 112, 2004.

VIEIRA, R.H.S.F.; ATAYDE, M.A.; CARVALHO, E.M.R.; CARVALHO, F.C.T.; FONTELES FILHO, A.D. Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.45, n.3, p.180-189, 2008.

VILA, J.; MARCO, F.; SOLER, L.; CHACON, M.; FIGUERAS, M.J. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.701–702, 2002.

VILLARI, P.; CRISPINO, M.; MONTUORI, P.; BOCCIA, S. Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral Waters. **Applied Environmental Microbiology** v.69, n.1, p. 697-701, 2003.

VINATEA, L. A. A. Modos de apropriação e gestão patrimonial de recursos costeiros: estudo de caso sobre o potencial e os riscos do cultivo de moluscos marinhos na Baía de Florianópolis. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, **Tese de Doutorado Interdisciplinar em Ciências Humanas**, 2000.

VITELA, M.R.T.; ESCARTIN, E.F. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in raw fish, oysters and shrimps. **Rev. Lat. Microb.**, v.35, n.3, p.267-72, 1993.

WEBSTER, L.F.; THOMPSON, B.C.; FULTON, M.H.; CHESTNUT, D.E.; VANDOLAH, R.F.; LEIGHT, A.K. Identification of sources of *Escherichia coli* in Carolina estuaries using antibiotic resistance analysis. **J Exp Mar Biol Ecol.** v.298, p.179–195, 2004.

WEST, P.A. The human pathogenic vibrios- A public health update with environmental perspectives. **Epidem. Infec.**, v.103, n.1, p.1-34, 1989.

World Health Organization (WHO). Cholera.Update, end of 1993. **Weekly Epidemiological Record**; v.69, n.3, p.13-17, 1994.

World Health Organization (WHO). Communicable disease Surveillance and Response (CSR). Cholera: Basic facts for travelers. Disponível em: <http://www.who.int/emc/disease/cholera/factstravellers.html>. Acesso em: 10.01.2007.

World Health Organization (WHO). Cholera.Update, end of 1993. **Weekly Epidemiological Record**, v.69, n.3, p.13-17, 1994.

World Health Organization (WHO).Cholera. The Epidemic in Peru – part II. **Weekly Epidemiological Record**, v.66, n.10, p.65-70, 1997.

YANO, Y.; YOKOYAMA, M.; SATOMI, M.; OIKAWA, H. & CHEN, S-S. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in china. **Journal of Food Protection**, v.67, n.8, p.1617-1623, 2004.

YENG, P. S.; BOOR, K. J. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio* infections. **Foodborne Pathog.Dis.**, v.1, n.2, p.74-88, 2004.

YII, K.C.; YANG, T.I.; LEE, K.K. Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers *Epinephelus coioides*. **Current Microbiology**, v.35, p.109-115, 1997.

ZAMARIOLI, L. A.. Estudo microbiológico do tecido mole de bivalves *Crassostrea brasiliana*, *Perna perna* e *Mytella falcata* recém coletados nos bancos naturais do litoral da baixada santista. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 1997. Relatório Apresentado ao Grupo de Vigilância Sanitária DIR XIX.

Anexo 01



Figura 01: Arquipélago de Santana – Ilhote Sul



Figura 02: Mexilhão *Perna perna*

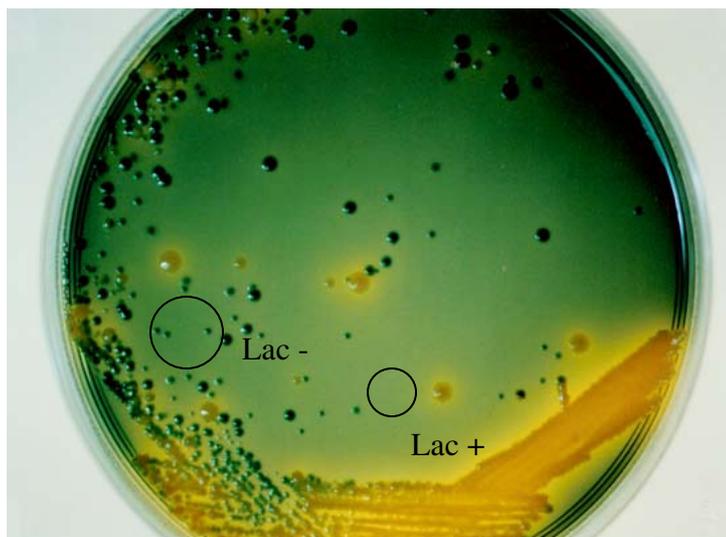


Figura 03: Agar TCBS
Lac: lactose



Figura 04: Agar GSP



Figura 05: O129 – S: sensível, R: resistente.



Figura 06: Perfil de Suscetibilidade de *Vibrio* spp.

Anexo 02

Quadro de Identificação de *Vibrio* spp. e *Aeromonas hydrophila*

| GLICOSE (GÁS) | MANITOL | LACTOSE | SACAROSE | ARABINOSE | MANOSE | MALTOSE | CELOBIOSE | CONTROLE | LISINA | ARGININA | ORNITINA | HALO 0% | HALO 3% | HALO 6% | HALO 8% | HALO 10% | SIM | VP | VM | NITR / NITRITO | ONPG | O\129 10µg | O\129 150µg | RESULTADO (n) |
|---------------|---------|---------|----------|-----------|--------|---------|-----------|----------|--------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|----------|-----|----|----|----------------|------|------------|-------------|-----------------------------------|
| - | + | - | + | - | + | + | - | + | + | - | + | - | + | + | + | + | -++ | + | + | + | - | R | S | <i>V. alginolyticus</i> (n=8) |
| - | + | - | - | + | + | + | - | + | + | - | + | - | + | + | + | - | -++ | - | + | + | - | R | S | <i>V. parahemolyticus</i> (n=3) |
| - | - | - | - | - | + | + | - | + | + | - | + | - | + | + | - | - | --+ | + | + | + | - | S | S | <i>V. damsela</i> (n=15) |
| - | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + | - | -++ | - | + | + | - | R | S | <i>V. fluvialis</i> (n=4) |
| - | + | - | + | - | + | NA | NA | + | + | - | + | - | + | + | + | - | -++ | - | + | + | - | S | S | <i>V. carchariae</i> (n=1) |
| - | + | + | + | - | + | NA | + | + | + | + | - | + | + | + | - | - | --+ | + | - | + | + | R | R | <i>Aeromonas hydrophila</i> (n=3) |
| - | + | - | + | + | + | NA | NA | + | + | + | - | - | + | + | - | - | -++ | + | - | + | + | S | S | <i>V. anguillarum</i> (n=2) |
| - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | -+- | + | + | + | - | R | S | <i>V. harveyi</i> (n=12) |
| - | + | - | + | - | + | + | - | + | + | - | + | - | + | + | - | - | -++ | - | + | + | + | S | S | <i>V. vulnificus</i> (n=2) |
| - | + | - | + | - | + | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | - | --- | - | + | + | - | R | S | <i>Vibrio</i> spp. (n=3) |

NA: não avaliado;

(+): positivo;

(-): negativo;

(R): resistente;

(S): sensível.

