

QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Aeromonas* spp. EM ÁGUAS DE SUPERFÍCIE DO ESTUÁRIO DO RIO BACANGA EM SÃO LUÍS / MA (BRASIL)

ANDRÉ GUSTAVO LIMA DE ALMEIDA MARTINS*
ADENILDE RIBEIRO NASCIMENTO**
REGINE HELENA SILVA DOS FERNANDES VIEIRA***
JOSILENE LIMA SERRA****
MARIA MARGARETH ROLIM MARTINS ROCHA*****

Para a quantificação e identificação de *Aeromonas* spp. foram coletadas 90 amostras de água de superfície do estuário do rio Bacanga em São Luís/MA, durante o período de março a outubro de 2007. As amostras foram submetidas ao método de plaqueamento direto em Ágar Gelatina Fosfato Sal para a contagem padrão (UFC/mL) e a técnica dos tubos múltiplos para a determinação do Número Mais Provável (NMP/100 mL) em Caldo Trypticase Soja. Os parâmetros físico-químicos: temperatura (°C), salinidade (%), oxigênio dissolvido (mg/L), pH, N-amoniacoal (N-NH_4^+) ($\mu\text{M/L}$) e nitrito ($\mu\text{M/L}$) foram analisados com a finalidade de avaliar possível influência do lançamento de esgotos domésticos “*in natura*” na proliferação dessa bactéria no ambiente estuarino. Os resultados mostraram ampla disseminação de *Aeromonas* no estuário, com valores variando entre $4,0 \times 10^1$ a $1,3 \times 10^8$ UFC/mL para a contagem padrão e de $2,3 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^7$ para o NMP/100 mL. Com relação aos parâmetros físico-químicos, apenas a temperatura, salinidade, pH e N-amoniacoal apresentaram correlações significativas com o crescimento dessa bactéria no ambiente estudado. Constatou-se ainda a distribuição sazonal dessa bactéria em relação à intensidade das chuvas e a proximidade com os pontos de emissões de esgotos domésticos. A alta incidência de *Aeromonas* no estuário do Bacanga representa risco para a saúde pública, uma vez que essa bactéria é comumente associada com gastroenterites e infecções extraintestinais.

PALAVRAS-CHAVE: *Aeromonas* spp.; ÁGUA; ESTUÁRIO.

- * Doutorando em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB (e-mail: andremartins1975@yahoo.com.br).
** Doutora em Microbiologia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA (e-mail: adenild@bol.com.br).
*** Doutora em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE (e-mail: regine@labomar.ufc.br).
**** Graduanda em Química Licenciatura, UFMA, São Luís, MA (e-mail: ls_josy@yahoo.com.br).
***** Engenheira da Pesca, UFPB, João Pessoa, PB (e-mail: margaretethufpb@gmail.com).

1 INTRODUÇÃO

Os problemas de saúde pública associados à poluição dos recursos hídricos não estão vinculados apenas aos organismos entéricos ou de origem fecal, mas também àqueles que ocorrem naturalmente nos ambientes aquáticos (ISLAM e TANAKA, 2004). As gastroenterites e as infecções cutâneas são, geralmente, causadas por bactérias autóctones de ambientes aquáticos, como *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp. Em função dos altos níveis de nutrientes na água, provenientes da entrada de material orgânico advindo das emissões de esgotos domésticos, tais bactérias têm seu crescimento favorecido com outros microrganismos heterotróficos (CHOPRA e HOUSTON, 1999).

Os representantes do gênero *Aeromonas* (do grego *aer-aire* = ar ou gás e *monas* = unidade, portanto, unidade produtora de gás) são bactérias gram negativas de forma bacilar, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, monotríquias, que utilizam a glicose como única fonte de energia. São amplamente distribuídas em ambientes aquáticos, sendo isoladas de águas doces, salgadas, tratadas, estuários e esgotos domésticos (ISONHOOD *et al.*, 2002). Espécies de *Aeromonas* são agentes significantes em doenças de origem alimentar, sendo isoladas de vegetais e de diversos produtos de origem animal, incluindo carne bovina, aves, peixes, camarões, leite e outros (GALBIS *et al.*, 2002).

Dentre as espécies descritas do gênero *Aeromonas*, somente cinco (*A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. jandaei* e *A. schubertii*) são reconhecidas como patógenos humanos, associadas principalmente com gastroenterites, septicemias e infecções do tecido mole em humanos. Além disso, a presença de *Aeromonas* em alimentos pode ser fatal para pacientes imunodeprimidos (JANDA e ABBOTT, 1998). Outras espécies, como *A. salmonicida*, são conhecidas como patógenos de peixes podendo causar mortalidade em massa. Esse patógeno emergente produz, comumente, diversos fatores de virulência (incluindo citotoxinas, enterotoxinas e hemólises) implicados na patogenicidade de humanos e animais aquáticos (TROWER *et al.*, 2000).

O estuário do rio Bacanga, localizado na parte ocidental da Ilha de São Luís, é considerado tipicamente urbano suprindo grande parte da população ribeirinha com alimento (pesca artesanal), além de contribuir para o abastecimento de água da capital. Contudo, o estuário vem sofrendo acelerado processo de degradação ambiental em função do esgoto doméstico lançado sem tratamento no leito do rio. Isso eleva os níveis de nutrientes, favorecendo o crescimento de bactérias autóctones, como *Aeromonas* (UFMA/LABOHIDRO, 1998).

O objetivo desta pesquisa foi quantificar o Número Mais Provável (NMP) e identificar cepas de *Aeromonas* spp. em águas de superfície do estuário do rio Bacanga em São Luís/MA. Pretendeu-se também efetuar medidas físico-químicas das amostras de água (pH, salinidade, temperatura (°C), Oxigênio dissolvido (O.D.mg/L), Nitrogênio-amoniacoal ($N-NH_4^+$) e presença de nitrito) e correlacioná-las com a distribuição dessa bactéria no estuário.

2 MATERIAL E MÉTODOS

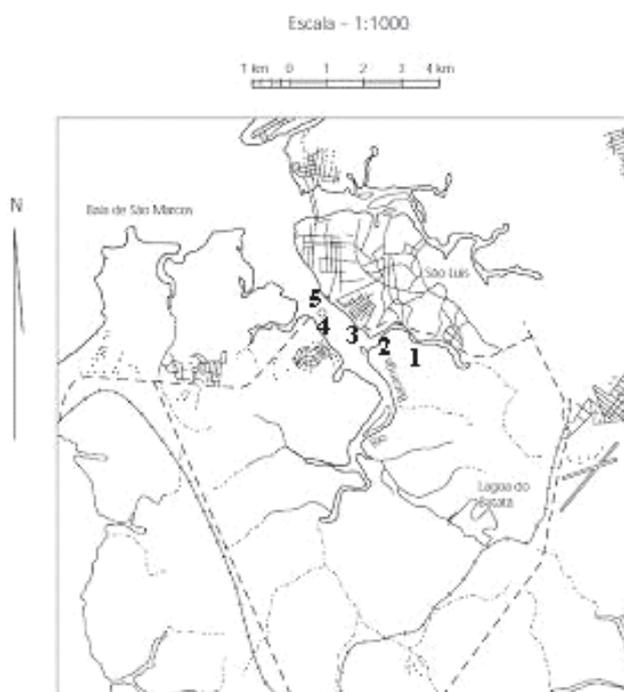
2.1 ESTUDO E AMOSTRAGENS

A pesquisa foi realizada em cinco pontos ao longo do estuário de rio Bacanga (Figura 1), localizado no Parque Estadual do Bacanga nas coordenadas geográficas: 2°32'26" - 2°38'7" latitude S e 44°16'00" - 44°19'16" de longitude W (MELO, 1998).

Durante o período de março a outubro de 2007 (exceção de maio e setembro) foram coletadas, mensalmente, três amostras de água em cada ponto. Cada retirada somou 15 amostras (totalizando 90), sendo as mesmas coletadas na profundidade de aproximadamente 30 cm abaixo da superfície da água. Para a coleta das amostras foram utilizados frascos esterilizados de boca larga, com tampas

esmerilhadas, os quais foram em seguida acondicionados e transportados assepticamente em caixas isotérmicas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Maranhão (PCQA – UFMA) para a execução das análises pertinentes.

FIGURA 1 - ÁREA ESTUARINA DO RIO BACANGA, COM A LOCALIZAÇÃO DOS CINCO PONTOS DE AMOSTRAGENS (1 - PARQUE TIMBIRA; 2 - PARQUE DOS NOBRES; 3 - MACAÚBA; 4 - SÁ VIANA E 5 - BARRAGEM)



Fonte: CARVALHO *et al.* (2000).

2.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP/100 mL) DE *Aeromonas* spp.

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP/100 mL) de *Aeromonas* spp. foram preparadas diluições decimais sucessivas (10^{-1} a 10^{-5}) em Água Peptonada Alcalina (APA). Em seguida, utilizando-se a técnica dos tubos múltiplos, inocularam-se alíquotas de 1 mL de cada diluição em cinco séries de cinco tubos contendo Caldo Trypticase Soja (Caldo TSB), adicionado de ampicilina na concentração de 20 µg/mL usada como inibidor da microbiota acompanhante das aeromonas. Após o período de incubação (28°C por 24 horas) de cada cultura positiva (tubos turvos) efetuaram-se estrias pela técnica de esgotamento na superfície do Ágar Gelatina Fosfato Sal (Ágar GSP), também acrescido de ampicilina (inibidor). Posteriormente ao período de incubação, as colônias características de *Aeromonas* foram isoladas e testadas bioquimicamente e os tubos positivos correspondentes usados para se computar o NMP de *Aeromonas*/100 mL.

2.3 CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS (UFC/mL) DE *Aeromonas* spp.

Para a contagem padrão das colônias típicas de *Aeromonas* nas amostras de água utilizou-se o Ágar Gelatina Fosfato Sal (Agar GSP), conforme HUGUET e RIBAS (1991), acrescido de 20 µg/mL de ampicilina, como meio seletivo de isolamento. As placas, preparadas em duplicata, foram inoculadas superficialmente com volumes de 0,1 mL a partir das diluições decimais, seguido do espalhamento com

auxílio de alça de Drigalski e posterior incubação a 28°C por 24 horas. A contagem das colônias típicas de *Aeromonas* (colônias de cor amarelada com halo claro ao redor da colônia) foi realizada com contador de colônias (modelo CP 600 Plus-Phoenix) nas placas que continham entre 30 e 300 colônias.

2.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *Aeromonas* spp.

As colônias características de *Aeromonas* foram isoladas em tubos de Ágar Trypticase Soja (Ágar TSA) inclinados e incubados a 28°C por 24 horas. Decorrido esse período, as cepas foram submetidas às provas bioquímicas para a identificação das espécies. Foram aplicados os seguintes testes: oxidase, catalase, coloração de Gram, produção de gás a partir da glicose, produção de indol, resistência ao agente vibriostático O/129, descarboxilação de aminoácidos (lisina, arginina e ornitina), teste em Ágar Tríplice Açúcar e Ferro (Ágar TSI), motilidade, redução de nitrato, hidrólise da esculina, teste de Voges-Proskauer, fermentação de carboidratos e crescimento em 3 e 6% de NaCl, segundo metodologia descrita no *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (PALUMBO *et al.*, 2001).

2.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A temperatura da água (°C) foi determinada usando-se termômetro comum de mercúrio, da marca Incoterm. Para a medida da salinidade (*in situ*) usou-se multissonda YSI Scientific Instrument. O método de Winkler, modificado por AMINOT e CHAUSSEPIED (1983), foi empregado para medir o oxigênio dissolvido (O.D.) nas amostras de água (expresso em mg de oxigênio por litro). As medidas de pH (*in situ*) ocorreram pelo método potenciométrico, utilizando-se medidor de campo (marca Hanna, modelo 8316) calibrado com padrões de 4,0 e 9,0 (AMINOT e CHAUSSEPIED 1983). Mediu-se o N-amoniaco (N-NH_4^+) pelo método citado por AMINOT e CHAUSSEPIED (1983), utilizando-se método espectrofotométrico (espectrofotômetro DR-2000, $\lambda = 543 \text{ nm}$) para a leitura das amostras. Também empregou-se o método espectrofotométrico de BENDSCHNEIDER e ROBINSON, citados por AMINOT E CHAUSSEPIED (1983), para detectar a presença de nitrito na água. Os parâmetros oxigênio dissolvido, N-amoniaco e nitrito foram utilizados para evidenciar a presença de esgotos domésticos nas águas do estuário do rio Bacanga.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram submetidos à análise de Correlação de Pearson utilizando-se o programa ASSISTAT (2008). Múltiplas correlações foram usadas para se determinar a relação entre os diferentes parâmetros físico-químicos medidos nas águas de superfície do estuário do rio Bacanga e as contagens (UFC/mL) de *Aeromonas* spp.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao NMP/100 mL e à contagem em placas de *Aeromonas* spp. em águas de superfície do estuário do rio Bacanga, no decorrer de seis meses de análises, estão expressos nas Tabelas 1 e 2.

Todos os pontos monitorados apresentaram altos índices de contaminação por *Aeromonas* com valores de NMP oscilando entre o mínimo de $2,3 \times 10^4$ e o máximo de $1,6 \times 10^7/100 \text{ mL}$. As contagens variaram entre $4,0 \times 10^1$ a $1,3 \times 10^8$ UFC/mL. As maiores contagens de *Aeromonas* spp. foram obtidas nos pontos 1 (Parque Timbira), 2 (Parque dos Nobres) e 3 (Macaúba) em função, principalmente, da sua proximidade com as fontes de lançamento de esgotos domésticos, o que contribui de forma

significativa para o crescimento de bactérias autóctones.

TABELA 1 - NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP/100 mL) DE *Aeromonas* EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE SUPERFÍCIE DO ESTUÁRIO DO RIO BACANGA EM SÃO LUÍS/MA

| Meses de amostragem | NMP/100 mL | | | | |
|---------------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | Ponto 1 | Ponto 2 | Ponto 3 | Ponto 4 | Ponto 5 |
| Março | * $2,4 \times 10^6$ a $1,6 \times 10^7$ | $2,4 \times 10^6$ a $1,6 \times 10^7$ | $2,3 \times 10^4$ a $2,4 \times 10^6$ | $1,6 \times 10^7$ | $2,4 \times 10^6$ a $1,6 \times 10^7$ |
| Abril | $1,6 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ |
| Junho | $1,6 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ | $2,4 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^6$ |
| Julho | $1,6 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^7$ | $2,4 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^6$ |
| Agosto | $2,4 \times 10^6$ a $1,6 \times 10^7$ | $2,3 \times 10^4$ a $2,4 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^6$ a $1,6 \times 10^7$ | $2,3 \times 10^5$ a $2,4 \times 10^6$ | $2,3 \times 10^5$ a $2,4 \times 10^6$ |
| Outubro | $2,4 \times 10^6$ | $2,3 \times 10^5$ a $2,4 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^6$ | $2,3 \times 10^5$ a $2,4 \times 10^6$ | $2,3 \times 10^5$ |

*Valores mínimos e máximos de cada ponto.

TABELA 2 - CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS (CPP/UFC/mL) DE *Aeromonas* EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE SUPERFÍCIE DO ESTUÁRIO DO RIO BACANGA EM SÃO LUÍS/MA

| Meses de amostragem | CPP (UFC/mL)* | | | | |
|---------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | Ponto 1 | Ponto 2 | Ponto 3 | Ponto 4 | Ponto 5 |
| Março | ** $4,0 \times 10^1$ a $9,0 \times 10^3$ | $3,0 \times 10^2$ a $5,6 \times 10^2$ | $3,2 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^4$ | $4,1 \times 10^3$ a $1,7 \times 10^4$ | $1,8 \times 10^2$ a $2,1 \times 10^3$ |
| Abril | $9,8 \times 10^4$ a $3,0 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^6$ a $8,8 \times 10^6$ | $7,1 \times 10^4$ a $8,2 \times 10^6$ | $4,1 \times 10^6$ a $1,1 \times 10^7$ | $5,1 \times 10^6$ a $7,7 \times 10^6$ |
| Junho | $3,0 \times 10^3$ a $1,5 \times 10^4$ | $2,3 \times 10^4$ a $7,0 \times 10^5$ | $3,5 \times 10^4$ a $1,2 \times 10^5$ | $4,1 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ | $5,8 \times 10^4$ a $5,1 \times 10^6$ |
| Julho | $2,0 \times 10^3$ a $4,0 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^4$ a $3,2 \times 10^6$ | $2,0 \times 10^3$ a $8,9 \times 10^3$ | $3,1 \times 10^5$ a $3,7 \times 10^5$ | $7,0 \times 10^1$ a $1,7 \times 10^4$ |
| Agosto | $1,1 \times 10^3$ a $4,7 \times 10^3$ | $1,4 \times 10^3$ a $2,6 \times 10^4$ | $4,7 \times 10^3$ a $5,1 \times 10^4$ | $5,0 \times 10^1$ | $5,0 \times 10^1$ a $2,5 \times 10^3$ |
| Outubro | $2,3 \times 10^3$ a $1,3 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^2$ a $4,6 \times 10^2$ | $3,6 \times 10^3$ a $2,7 \times 10^4$ | 0 | 0 |

*UFC/mL = Unidade Formadora de Colônia por mL.

**Valores mínimos e máximos de cada ponto.

Segundo a Tabela 1, no mês de abril, pico do período chuvoso, ocorreram as maiores contagens de *Aeromonas* spp., com valores oscilando entre o mínimo de $9,8 \times 10^4$ UFC/mL e máximo de $3,0 \times 10^7$ UFC/mL e NMP de $1,6 \times 10^7/100$ mL. Os menores índices foram obtidos no mês de outubro (pico do período seco), principalmente nos pontos 4 e 5 (Sá Viana e Barragem). Esse declínio pode ser observado a partir do mês de agosto quando as chuvas tendem a diminuir. Torna-se evidente então, a distribuição sazonal de *Aeromonas* no estuário do Bacanga em relação à intensidade de chuvas e proximidade com os pontos de emissão de esgotos domésticos.

Alguns estudos comprovam a ocorrência sazonal das espécies de *Aeromonas* em ambientes aquáticos. SOUSA e SOUZA (2001) em estudo sobre a comunidade bacteriana associada com peixes e águas do Rio Gongonhas, no Paraná (Brasil), observaram que a maior contagem de *Aeromonas* ocorreu no período em que a temperatura da água estava mais elevada. Pesquisa efetuada para investigar a resistência antimicrobiana de *Aeromonas* spp. mesófilas, isoladas de dois rios europeus, revelou que 75% dos isolados foram de *A. caviae*, 16% *A. sobria* e 9% *A. hydrophila*. Também foi constatado maior número de isolamento nos meses mais quentes (URRIZA *et al.*, 2000).

No decorrer dos seis meses de análises foram isoladas cerca de 751 cepas das amostras de água, sendo 582 (77,5%) positivas para *Aeromonas*. Dentre as espécies de *Aeromonas* isoladas das amostras de água foram identificadas: *A. caviae* (52,7%), *A. hydrophila* (23,8%), *A. veronii* (19,5%) e *A. sobria* (3,7%). As cepas não identificadas ao nível de espécie pelos testes bioquímicos foram classificadas como *Aeromonas* spp.

Muito embora a espécie *Aeromonas hydrophila* seja a mais preocupante em termos de patogenicidade, não se deve esquecer que *Aeromonas caviae*, isolada de todas as amostras estudadas, também produz fatores de virulência. GAUTAM, PATHAK e RAMITEKE (1992) afirmaram que *A. caviae* apresenta menor patogenicidade, mas em algumas áreas geográficas destaca-se por estar associada com casos de diarreia.

FIORENTINI *et al.* (1998) ao avaliarem a ocorrência, densidade e patogenicidade de *Aeromonas* spp. em águas de dois estuários na costa italiana, constataram que *A. caviae* foi a espécie predominante (46% das cepas) em ambos os estuários, seguida por *A. sobria* (22%), *A. hydrophila* (16%) e *A. veronii* (12%). Na mesma pesquisa, os autores observaram que *A. hydrophila* e *A. caviae* foram respectivamente as fenoespécies mais frequentes nas áreas com e sem tratamento de esgoto. ARAÚJO, ARRIBAS e PARES (1991) e MONFORT e BALEUX (1991) relataram que *A. hydrophila* está adaptada para águas não poluídas e *A. caviae* para águas com elevados níveis de poluição fecal.

Os dados obtidos discordam dos resultados de LEITÃO e SILVEIRA (1991), que utilizaram o método de plaqueamento direto em Ágar Amido-Ampicilina. Constataram que 77% das amostras de água e pescado de origem marinha e doce foram positivas para *Aeromonas* spp., com maior frequência da espécie *A. hydrophila*. Diferem ainda dos encontrados por MATTÉ *et al.* (1995) que analisaram 64 amostras de água de superfície e 24 de sedimento da Represa de Guarapiranga em São Paulo. Em 76,6% das amostras por eles analisadas foram isoladas *A. jandaei* (43,7%), *A. sobria* (31,2%), *A. caviae* (10,4%) e *A. hydrophila* (14,7%).

Os dados comentados permitem inferir que diferentes espécies de *Aeromonas* spp. podem estar presentes nos ambientes aquáticos, e que cada ambiente apresenta características distintas que podem influenciar os resultados.

O fato de *A. caviae* predominar em ambientes poluídos e, também, de ter sido a espécie mais isolada em todas as amostras de água analisadas, reforça ainda mais a hipótese de que a emissão de esgotos domésticos *in natura* nas águas do estuário do rio Bacanga contribui significativamente para a proliferação dessa e de outras espécies do gênero *Aeromonas*. Muito embora a legislação não inclua a presença de *Aeromonas* em águas e alimentos, a alta prevalência ambiental dessa bactéria pode ser considerada como importante ameaça à saúde pública, sendo que as infecções provocadas por esse patógeno geralmente acontecem mediante contato direto com a água e os alimentos contaminados (CHOPRA e HOUSTON, 1999).

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes aos parâmetros físico-químicos medidos nas amostras de água de superfície do estuário do rio Bacanga.

A temperatura não apresentou variações muito significativas, oscilando entre o mínimo de 28°C e o máximo de 31,5°C durante os meses de amostragem, tendo a temperatura da água acompanhado a variação da temperatura do ar atmosférico. Os maiores valores de temperatura ocorreram no mês de outubro (pico do período de seca) e os menores em abril (pico do período chuvoso).

Pelo fato das *Aeromonas* serem autóctones de ambientes aquáticos, essas bactérias se adaptam e sobrevivem às mudanças ambientais (pH, temperatura, salinidade e baixa disponibilidade de nutrientes), podendo ser usadas como indicadoras do estado trófico das águas (ISONHOOD *et al.*, 2002). A capacidade de crescer em temperaturas extremas varia entre as cepas de *Aeromonas* e parece estar intimamente relacionada à origem das cepas. MATEOS *et al.* (1993) constataram que cepas isoladas de amostras ambientais produzem mais toxinas a 28°C, enquanto que as isoladas de humanos apresentam características mesófilas e produzem toxinas a 37°C (TSAI, TSAI e KONG, 1997).

TABELA 3 - VALORES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS MEDIDOS NAS ÁGUAS DE SUPERFÍCIE DO ESTUÁRIO DO RIO BACANGA EM SÃO LUÍS/MA - MARÇO A OUTUBRO/2007

| Meses de Amostragem | Parâmetros* | | | | | |
|---------------------|--------------------------|----------------|-----------|----------------------------|--|--------------------------------------|
| | Temperatura da água (°C) | Salinidade (%) | pH | Oxigênio Dissolvido (mg/L) | N-NH ₄ ⁺ (μM/L)* | NO ₂ ⁻ (μM/L)* |
| Março | **29 a 30,5 | 18,9 a 29,2 | 7,4 a 8,5 | 2,68 a 5,27 | 2,35 a 17,50 | 0,45 a 1,31 |
| Abril | 28 a 30 | 4,1 a 7,8 | 6,3 a 8,2 | 1,41 a 4,63 | 27,28 a 81,21 | 0,07 a 0,85 |
| Junho | 29 a 30,5 | 13,2 a 19,6 | 7,6 a 8,2 | 2,05 a 4,70 | 20,14 a 147,07 | 0,07 a 0,85 |
| Julho | 28,5 a 30,5 | 17,3 a 23,8 | 6,8 a 7,5 | 2,00 a 4,25 | 37,07 a 66,21 | 1,09 a 1,32 |
| Agosto | 29,5 a 31 | 19,7 a 24,2 | 7,3 a 8,6 | 3,92 a 5,02 | 39,14 a 99,57 | 1,72 a 3,26 |
| Outubro | 28,5 a 31,5 | 23,1 a 27,4 | 7,6 a 8,5 | 3,17 a 5,05 | 3,57 a 107,85 | 0,34 a 1,34 |

*N-NH₄⁺: Nitrogênio Amoniacal; NO₂⁻: Nitrito.

**Valores mínimos e máximos em cada mês.

No que se refere à salinidade, fator que está sujeito às variações dos parâmetros ambientais (principalmente no que diz respeito ao aporte fluvial, à precipitação pluviométrica, à evaporação e à contribuição marinha), os valores extremos ficaram entre o mínimo de 4,1% e o máximo de 29,2% (Tabela 3). Os valores mínimos para esse parâmetro foram obtidos nos pontos 1 e 2 (correspondentes aos bairros Parque Timbira e Parque dos Nobres), durante o período de maior intensidade de chuva e por estarem mais distantes da barragem. Já os maiores valores foram obtidos durante o período seco nos pontos 3, 4 e 5 (correspondentes aos bairros Sá Viana, Macaúba e a Barragem) por estarem situados próximos à barragem e serem influenciados pela maré salina da baía de São Marcos. Outros fatores que podem ter influenciado o aumento da salinidade seriam a elevação da temperatura ambiente, seguida pelo aumento no índice de evaporação e diminuição da intensidade de chuvas.

De modo geral, as aeromonas não toleram salinidades >5% de NaCl e, dependendo da temperatura, a salinidade pode atuar como fator limitante na proliferação da bactéria (KNØCHEL, 1990). MARCEL, ANTOINETTE e MIREILLE (2002) estudaram espécies de *Aeromonas* num estuário tropical eutrófico. Observaram que a maior frequência de isolamento de espécies de *Aeromonas* ocorreu na área urbana do estuário (82,53%), durante a estação chuvosa. Quando a salinidade da água ficava abaixo de 10‰, *A. hydrophila* só era recuperada nessa estação. A menor frequência de isolamento foi verificada durante a estação seca (salinidade acima de 10‰).

Os valores de pH, ao longo dos pontos de amostragem oscilaram entre o mínimo de 6,3 e o máximo de 8,6. Nos pontos 3, 4 e 5 foram registrados valores de pH que variaram de ligeiramente alcalinos a alcalinos (7,2 a 8,6), devido a esses pontos estarem localizados mais próximos à barragem e sofrerem influência marinha, diferentemente dos pontos 1 e 2 (6,3 a 7,9). *Aeromonas* toleram bem valores altos de pH, razão pela qual se usa Água Peptonada Alcalina (APA) (pH 8,5-8,8) como método de enriquecimento. TSAI e CHEN (1996), analisando a incidência e toxigenicidade de *Aeromonas hydrophila* em frutos do mar, constataram que *Aeromonas* crescem em faixas de pH que variam de 5,5 a 9,0. Entretanto, observaram que sua tolerância ao pH parece variar com a temperatura de incubação das cepas. GALBIS *et al.* (2002) constataram que em temperatura de incubação de 28°C, considerada ótima de crescimento, *Aeromonas* multiplicam-se bem em meios com pH variando de 6,5 a 7,2, porém em pH 5,5 apresentam crescimento retardado. Assim, os valores de pH medidos nas águas de superfície do rio Bacanga são favoráveis ao crescimento de *Aeromonas*.

A distribuição espaço temporal do oxigênio dissolvido medido nas águas de superfície do estuário do rio Bacanga revelou valores que variaram de 1,41 a 5,27 mg/L (Tabela 3). Os menores valores foram medidos nos pontos 1, 2 e 3, nos quais o consumo de oxigênio pelo processo de decomposição da matéria orgânica é bem mais elevado em função do esgoto doméstico e do material orgânico oriundo de manguezais adjacentes. Os valores máximos foram observados nos pontos 4 e 5 devido sua distância em relação às emissões de esgotos, além da turbulência provocada pela ação da barragem e pela elevada produção primária. Os processos de circulação e mistura são deficientes no sistema Bacanga em função da barragem do mesmo nome, o que impede o fluxo e refluxo das águas pela ação das marés. Isto impede a renovação das águas e provoca acúmulo de matéria orgânica de origem natural (manguezal) e antropogênica (esgoto e lixo doméstico), intensificando o consumo de oxigênio nos processos de oxidação química e biológica da matéria orgânica. O oxigênio dissolvido é um dos gases mais importantes para o sistema aquático, tanto por ser vital aos organismos aeróbios no processo de respiração quanto na participação de vários processos biogeoquímicos, podendo ser considerado também como bom indicador da qualidade ambiental (CHESTER, 1996).

No decorrer da pesquisa, os valores obtidos para o N-amoniaco ficaram em torno do mínimo de 2,36 µM no ponto 3 no mês de março e o máximo de 147,0 µM no mesmo ponto no mês de junho. Observou-se ainda variação temporal, isto é, aumento gradual no decorrer dos meses de coleta (Tabela 3). A amônia orgânica/NH₃ na sua forma livre é tóxica, porém muito volátil e a sua presença nos ambientes aquáticos caracteriza poluição recente por esgotos domésticos. A sua conversão a nitrito e depois a nitrato (nitrificação) consome o oxigênio dissolvido alterando, assim, as condições bioquímicas do sistema aquático. A amônia constitui, portanto, bom traçador de poluição urbana (GÖRGÉNYI *et al.*, 2005).

De acordo com os resultados obtidos, o ambiente estuarino estudado (estuário do rio Bacanga) pode ser caracterizado como ambiente poluído conforme a Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005). Essa rege que o ambiente estuarino deve apresentar valores de até 0,4 mg/L NH₄⁺, sendo que o principal fornecedor de nitrogênio amoniacal e de outros nutrientes para o sistema estuarino é o esgoto doméstico lançado pelos bairros situados nos arredores do estuário. Nesse sistema estuarino, os valores para nitrito na maioria das vezes foram baixos (variando de 0,07 µM a 3,86 µM). Os menores valores foram obtidos nos pontos 4 e 5 que

sofrem pouca influência dos esgotos domésticos e os mais elevados nos pontos 1, 2 e 3 em que a influência antrópica é mais acentuada (Tabela 3). A variação sazonal no estuário, em relação a esse parâmetro, foi pouco evidenciada, tanto no período chuvoso quanto no período de estiagem. Entretanto, houve tendência de aumento do nitrito a partir do mês de julho em todos os pontos, com valores oscilando entre de 1,09 μM e 3,26 μM , e decréscimo súbito no mês de outubro. Os valores baixos de nitrito podem ser explicados em razão do seu consumo por algumas espécies de fitoplâncton e/ou bactérias e pelo processo de redução ou oxidação. Já, os valores elevados ocorrem em função da desnitrificação (redução dos íons nitrato ou oxidação do amônio) (PANSWAD e ANAN, 1999).

As matrizes de correlação para as contagens de *Aeromonas* spp. e os parâmetros físico-químicos medidos nas águas de superfície do estuário do rio Bacanga durante os meses de coleta são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 - CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE *Aeromonas* spp. E OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS MEDIDOS NA ÁGUAS DE SUPERFÍCIE DO ESTUÁRIO DO RIO BACANGA, SÃO LUÍS/MA

| Variáveis | Coeficiente de Correlação (r); $p \leq 0,05$ | | | | | |
|------------------------------|--|-------|-------|-------|------------------------------|------------------------------|
| | Temp. | O.D. | Sal. | pH | NH ₄ ⁺ | NO ₂ ⁻ |
| O.D. | 0,72 | | | | | |
| Sal. | 0,54 | 0,43 | | | | |
| pH | 0,67 | 0,59 | 0,48 | | | |
| NH ₄ ⁺ | -0,35 | -0,42 | -0,28 | -0,17 | | |
| NO ₂ ⁻ | 0,11 | 0,08 | 0,23 | -0,20 | 0,11 | |
| <i>Aeromonas</i> spp. | -0,39 | -0,08 | -0,16 | -0,15 | 0,17 | -0,02 |

Temp.= temperatura; O.D. = oxigênio dissolvido; Sal.= salinidade; NH₄⁺ = N-amoniacoal; NO₂⁻ = nitrito.

De acordo com a Tabela 4, somente a temperatura, a salinidade, o pH e o nitrogênio amoniacoal (N-NH₄⁺) apresentaram correlações significativas em relação às contagens de *Aeromonas* nas águas do estuário ($r = -0,39$; $r = -0,16$; $r = -0,15$ e $r = 0,17$, respectivamente, para $pd < 0,05$ – Teste de Pearson), podendo, assim, influenciar a distribuição dessa bactéria no ambiente estudado. Os demais parâmetros não demonstraram resultados significativos quando correlacionados ao número de isolamento de *Aeromonas* ($r = -0,08$; $r = -0,02$, respectivamente; $pd < 0,05$).

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, o estuário do rio Bacanga encontra-se contaminado com bactérias do gênero *Aeromonas* em razão dele atuar como bacia de recepção de esgotos da cidade, cuja entrada em excesso de nutrientes (principalmente material de origem fecal) favorece a proliferação tanto de organismos autóctones (*Aeromonas*), como de microrganismos heterotróficos contaminantes de ambientes aquáticos (*Escherichia coli*). *Aeromonas* são, geralmente, associadas com gastroenterites e infecções cutâneas. Assim, a alta incidência dessa bactéria no

estuário em questão representa risco para a saúde das comunidades localizadas às suas margens, as quais o utilizam tanto para atividades de recreação quanto para a pesca.

ABSTRACT

QUANTIFICATION AND IDENTIFICATION OF *Aeromonas* spp. IN ESTUARINE SURFACE WATER OF THE BACANGA RIVER, SÃO LUÍS, MA (BRAZIL)

To quantify and identify *Aeromonas* spp., 90 samples of estuarine surface water were collected from the Bacanga's river in São Luís/MA, from March to October 2007. Samples were submitted to spread directly in Gel Salt Phosphate Agar method (CFU/mL) and by the Most Probable Number (MPN/100 mL) in Trypticase Soya Broth. The physical and chemical parameters: temperature (°C), salinity (%), dissolved oxygen (mg/L), pH, ammonia-N (N-NH_4^+) ($\mu\text{M/L}$) and nitrite ($\mu\text{M/L}$) were analyzed to evaluate possible influence of the release of domestic sewage "in natura" in the proliferation of these bacteria in the estuarine environment. The results obtained indicated a wide dissemination of *Aeromonas* in the estuary, with values ranged between 4.0×10^1 to 1.3×10^8 CFU/mL, whereas the values for MPN/100 mL ranged between 2.3×10^4 to 1.6×10^7 . In relation to physical and chemical parameters, only temperature, salinity, pH and ammonia-N present significant correlation on the growth of bacteria in the environment studied. Seasonal variations were verified by the higher indices of *Aeromonas* obtained during the rainy season and the proximity with the sources point of domestic sewage. High frequency of *Aeromonas* in the Bacanga estuary represents risk to the public health, since this bacterium is commonly associated with gastroenteric disease and extra-intestinal infections.

KEY-WORDS: *Aeromonas* spp.; WATER; ESTUARY.

REFERÊNCIAS

- 1 AMINOT, A.; CHAUSSEPIED, M. **Manuel des analyses chimiques en milieu marin**. Brest: Centre National Pour L'exploitation Des Océans (CNEXO), 1983. 395 p.
- 2 ARAÚJO, R.M.; ARRIBAS, R.M.; PARES, R. Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. **Journal of Applied Bacteriology**, v.71, p.182-186, 1991.
- 3 ASSISTAT. **Assistência Estatística**. Versão 7.5 beta. Disponível em: www.assistat.com. Acesso em: 06 nov 2008.
- 4 BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005. Classificação das águas doces, salobras e salinas do território nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 17 de março de 2005. Seção 1, p.11356-11361.
- 5 CARVALHO, G. P.; CAVALCANTE, P.R.S.; CASTRO, A.C.L.; ROJAS, M.O.A.I. Preliminary assessment of heavy metal levels in *Mytella falcata* (Bivalvia, Mytilidae) from Bacanga river estuary, São Luís, State of Maranhão, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira Biologia**, v.60, n.1, p.11-16, 2000.
- 6 CHESTER, R. **Marine Geochemistry**. London: Unwin Hyman, 1996.
- 7 CHOPRA, A .K.; HOUSTON, C.W. Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. **Microbes and Infection**, v.1, p.1129-1137, 1999.
- 8 FIORENTINI, C.; BARBIERI, E.; FALZANO, L.; MATARESSE, P.; BAFONNE, W.; PIANETTI, A.; KATOULI, M.; KUHN, I.; MOLLBY, R.; BRUSCOLINI, F.; CASIERE, A.; DONELLI, G. Occurrence, diversity and pathogenicity of mesophilic *Aeromonas* in estuarine waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. **Journal Applied Microbiology**, v.85, p.501-511, 1998.
- 9 GALBIS, D.M.; FARFÁN, M.; LORÉN, J.G.; FUSTÉ, M.C. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p.420-430, 2002.
- 10 GAUTAM, A.R.; PATHAK, S.P.; RAMITEKE, P.W. Virulence factors in environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Journal General Applied Microbiology**, v.38, p.185-191, 1992.

- 11 GÖRGÉNYI, M.; DEWULF, J.; LANGENHOVE, H.V.; KIRÁLY, Z. Solubility of volatile organic compounds in aqueous ammonia solution. **Chemosphere**, v. 59, n. 8, p.1083-1090, 2005.
- 12 HUGUET, J.M.; RIBAS, F. SGAP-10C agar for the isolation and quantification of *Aeromonas* from water. **Journal Applied Bacteriology**, v.70, p. 81-88, 1991.
- 13 ISLAM, M.S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, v.4, p.624-649, 2004.
- 14 ISONHOOD, J.H.; GERARD, P.; LEENANON, B.; DRAKE, M. Stress response of *Aeromonas hydrophila* following environmental challenges. **Food Microbiology**, v.19, p.285-293, 2002.
- 15 JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Reviews of Infectious Disease**, v.27, p. 332-44, 1998.
- 16 KNØCHEL, S. Growth characteristics of motile *Aeromonas* spp. isolated from different environments. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, p.235-244, 1990.
- 17 LEITAO, M.F.F.; SILVEIRA, N.F.A. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* na água, pescado e hortaliças, no Estado de São Paulo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)**, v.21, n.1, p.90-99, jan./jun.1991.
- 18 MARCEL, K.A.; ANTOINETTE, A.A.; MIREILLE, D. Isolation and characterization of *Aeromonas* species from an eutrophic tropical estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v.44, p.1341-1344, 2002.
- 19 MATEOS, D.; ANGUITA, J.; NAHARRO, G.; PANIAGUA, C. Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. **Journal Applied Bacteriology**, v.74, p.111-118, 1993.
- 20 MATTÉ, M.H.; MATTÉ, G.R.; BALDASI, L.; NITRINI, S. M. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em água da represa destinada à recreação e captação para abastecimento público. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18., 1995, Santos. **Anais... Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia**, 1995. p.49.
- 21 MELO, O. T. **Comportamento biogeoquímico de nutrientes no estuário do rio Bacanga, ilha de São Luis-MA**. Belém, 1998. 115 f. Dissertação (Mestrado em geoquímica) – Curso de Pós-graduação em Geologia e Geoquímica, Centro de Geociências, Universidade Federal do Pará.
- 22 MONFORT, P.; BALEUX, B. Distribution and survival of motile *Aeromonas* spp. in brackish water receiving sewage treatment effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2459-2467, 1991.
- 23 PALUMBO, S.; ABEYTA, C.; STELMA, G.; WESLEY, I.W.; WEI, C.; KOBERGER, J.A.; FRANKLIN, S.K.; TUCKER, L.S.; MURANO, E.A. *Aeromonas*, *Arcobacter* and *Plesiomonas*. In: COMPENDIUM of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. Washington: APHA, 2001. p. 283-290. Chap. 30.
- 24 PANSWAD, T.; ANAN, C. Specific oxygen, ammonia, and nitrate uptake rates of a biological nutrient removal process treating elevated salinity wastewater. **Bioresource Technology**, v. 70, p.237-243, 1999.
- 25 SOUSA, J. A.; SOUZA, A.T.S. Bacterial community associated with fish and water from Congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 4, p. 373-381, 2001.
- 26 TROWER, C.J.; ABO, S.; MAJEED, K.N.; VON ITZSTEIN, M. Production of an enterotoxin by a gastroenteritis associated *Aeromonas* strains. **Journal Medical Microbiology**, v.49, p.121-6, 2000.
- 27 TSAI, G.J.; TSAI, F.C.; KONG, Z.L. Effects of temperature, medium composition, pH, salt and dissolved oxygen on haemolysin and cytotoxin production by *Aeromonas hydrophila* isolated from oyster. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.111-116, 1997.
- 28 TSAI, G.J.; CHEN, T.H. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 121-131, 1996.

- 29 UFMA/LABOHIDROS. Universidade Federal do Maranhão. **Diagnóstico ambiental do Estuário do Rio Bacanga, Ilha de São Luís-Ma:** características químicas e biológicas, 1998. 116 p.
- 30 URRIZA, M.G.; PINEAU, L.; CAPDEPUY, M.; ROQUES, C.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 297-301, 2000.