

**LÍLIAN SAUER ALBERTINI**

**ECOLOGIA, FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA E DIVERSIDADE DE  
*Escherichia coli* ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DE  
LASTRO, ÁGUA DE REGIÕES PORTUÁRIAS E  
MOLUSCOS BIVALVES NO BRASIL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Irma. N. G. Rivera

São Paulo

2009

## **RESUMO**

ALBERTINI, L. S. **Ecologia, fatores associados à virulência e diversidade de *Escherichia coli* isolados de amostras de água de lastro, água de regiões portuárias e moluscos bivalves no Brasil.** 2009. 215 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Os ecossistemas aquáticos possuem microrganismos transitórios que chegam através do ar, solo, despejos industriais e domésticos e através da água de lastro de navios, degradando a qualidade da água. *Escherichia coli* foi isolado de amostras de água de lastro, água de regiões portuárias e de bivalves e dos 331 isolados de *E. coli* estudados, 49,6% apresentaram múltipla resistência variando de 2 a 8 antibióticos. Todos eles foram resistentes a eritromicina, característica natural da espécie. Dois isolados de amostras de água de região portuária de Paranaguá (2/42), possuíam os seguintes antibioticotipos: AMI AMP CTX CAZ CPX ERI PPT SUT e AMI AMC AMP CTX CAZ CRX ERI SUT. Sete fatores associados à virulência foram pesquisados utilizando a técnica de hibridação radioativa: Toxina termoestável (ST), Toxina termolábil (LT), Adesão agregativa (EAEC), Fator de invasão (INV), Toxina “Shiga-like” I (*stx-1*), Toxina “Shiga-like” II (*stx-2*), e o gene que codifica para a intimina (*eae*). Os resultados positivos da hibridação foram confirmados através da reação em cadeia de polimerase e somente 4 isolados apresentaram homologia com o gene que codifica para Aderência Agregativa (AA) de EAEC, 3 para *eae*, 3 para ST e um para *stx2*. Em relação à pesquisa da presença de plasmídeos, um total de 80,0% (24/30) e 72,3% (68/94) dos isolados de *E. coli* de amostras de água de lastro e de amostras de água de regiões portuárias apresentaram plasmídeos, respectivamente. Neste estudo, os isolados de *E. coli* de amostras de moluscos bivalves coletados nas proximidades das regiões portuárias estudadas mostraram que 75,3% (55/73) possuem plasmídeos e 56,8% dos mesmos correspondem a plasmídeos com fragmentos entre 2027 pb e 23.099 pb. Na caracterização molecular dos isolados, verificou-se que o ERIC-PCR apresentou um melhor desempenho pelo maior número de *clusters* com similaridade maior que 70%. A presença de isolados contendo os genótipos encontrados, nos remetem a analisar a importância sobre o risco da presença de *E. coli* patogênica no ambiente marinho costeiro e em água de lastro. Por isso, programas de vigilância sanitária devem ser implementados para proteger a saúde humana, animal e do meio ambiente.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*. Resistência aos antibióticos. Fatores associados à virulência. Plasmídeos. ERIC-PCR. REP-PCR. Água de lastro. Água de regiões portuárias. Moluscos bivalves.

## ***ABSTRACT***

ALBERTINI, L. S. **Ecology, virulence factors and diversity of *Escherichia coli* isolated from ballast water, ports areas and bivalves samples in Brazil.** 2009. 215 f. Ph. D. Thesis (Science) - Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

The aquatic ecosystems had transitory microorganisms that arrived through the air, soil, industrial and domestic sewage and ballast water, degrading the water quality. *Escherichia coli* was isolated from ballast water, port areas water and bivalves samples. All of them were resistant to erythromycin, natural behavior of this specie. However, from the 331 isolates of *E. coli* studied, 49.6% had multiple antibiotics resistant varied from 2 to 8 antibiotics. Two isolates from Paranaguá Port area water samples (2/42), showed the following antibiotics type: AMI AMP CTX CAZ CPX ERI PPT SUT and AMI AMC AMP CTX CAZ CRX ERI SUT. Seven virulence associated factors were investigated using radioactive hybridization: heat stable toxin (ST), heat labile toxin (LT), aggregative adhesion (EAEC), invasion factor (INV), Shiga-like I toxin (STx-1), Shiga-like II toxin (STx-2), and the gene that codify for intimin (*eae*). The positive results were confirmed through polymerase chain reaction and only 4 isolates presented homology to the gene that codify for aggregative adherence (AA) of EAEC, 3 for *eae* gene, 3 for ST and one for *stx2*. Concerning the plasmids study, a total of 80.0% (24/30) and 72.3% (68/94) of *E. coli* isolates from ballast water and port area water samples had plasmids, respectively. In this study the *E. coli* isolates from bivalves samples showed that 75.3% (55/73) had plasmids and 56.8% of them had plasmids with size from 2027 bp and 23,099 bp. The molecular characterization of isolates verified that the ERIC-PCR was more efficiency to show high number of clusters with similarity more than 70%. The presence of *E. coli* isolates contained dangerous genotypes, showed the microbial risk present at the coast area ecosystem and ballast water samples and sanitary surveillance programs must be implemented for human, animal and aquatic ecosystem health protection.

**Key-words:** *Escherichia coli*. Antibiotic Resistance. Virulence factors. Plasmids. ERIC-PCR. REP-PCR. Ballast water. Port areas. Bivalves.

## ***1 INTRODUÇÃO***

---

A água é um elemento de importância fundamental para a sobrevivência do homem. Seu desempenho nos setores industrial e agropecuário, no abastecimento público, na preservação da vida aquática, nas atividades recreacionais e no transporte marítimo confirmam essa importância vital. Três quartos da superfície da Terra são cobertos por água, sendo que 97,4% é salgada e constituem os oceanos e 1,8% está congelada e se encontra nas regiões polares. Desta forma, a água doce disponível para a população do planeta representa apenas 0,8%, e parte desta está contaminada, segundo dados da COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB, 2004).

O desenvolvimento industrial, o crescimento demográfico e a ocupação do solo de forma intensa e acelerada têm provocado esta contaminação que compromete os recursos hídricos disponíveis para o consumo humano e para fins recreacionais, aumentando consideravelmente o surgimento de doenças de veiculação hídrica (RIVERA e MARTINS, 1996). Particularmente, a água contaminada é responsável por 80% das doenças nos países em desenvolvimento, segundo dados da “WORLD HEALTH ORGANIZATION” (WHO, 2006), constituindo, desta forma, uma ameaça à saúde pública (MARTINS et al., 1993).

O reconhecimento da gravidade presente nas águas receptoras de esgotos domésticos, como possíveis veículos de transmissão de agentes de doenças infecciosas e parasitárias, ocorreram com a descoberta dos agentes etiológicos das doenças infecciosas e da sua eliminação juntamente com as fezes dos indivíduos doentes ou portadores, como a do *Vibrio cholerae* em 1854, da *Entamoeba histolytica* em 1875 e da *Shigella dysenteriae* em 1898 (REINHART, 1980). Diversas doenças são associadas à água, e podem ocorrer pela contaminação por excreções humanas ou de outros animais ou pela presença de substâncias químicas nocivas à saúde humana (CETESB, 2004). Segundo dados do “NATIONAL RESEARCH COUNCIL”, vírus e bactérias são os principais responsáveis por doenças transmitidas pela água e alimentos (NRC, 1999) (Tabela 1).

Os ecossistemas aquáticos costeiros podem ser contaminados por receberem esgotos domésticos e/ou pelo deslastre dos navios que transportam e introduzem

microrganismos, parasitas e outros organismos de um ambiente para outro. Quando ingeridas acidentalmente por banhistas ou atingir áreas de cultivo e/ou extração de moluscos bivalves, podem por em risco a saúde da população.

Em termos de Saúde Pública, os aspectos sanitários devem ser enfocados, estudando-se o comportamento dos indicadores de poluição de origem fecal, sendo mais comumente utilizados o grupo dos coliformes fecais ou termotolerantes, e os enterococos fecais [AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA, 1985)]. Neste âmbito, devido à crescente preocupação que vem ocorrendo conseqüente de problemas oriundos da poluição e/ou contaminação das águas costeiras, isolaram-se *E. coli* de várias amostras de água coletadas em sete portos brasileiros, água de lastro de navios que ancoraram em nove portos brasileiros e de moluscos bivalves coletados in natura em áreas próximas a regiões portuárias brasileiras.

**Tabela 1** - Listagem dos principais agentes etiológicos das doenças veiculadas pela água e suas rotas de transmissão ao homem.

Agente etiológico	Doença	Rota de transmissão
<b>Viroses</b>		
Vírus da hepatite A	Hepatite infecciosa	Alimento marinho <sup>b</sup> , água <sup>c</sup>
Vírus da hepatite E	Hepatite	Água <sup>c</sup>
Calicivírus	Gastroenterite	Alimento marinho <sup>b</sup> , água <sup>c</sup>
Rotavírus	Gastroenterite infantil	Água <sup>c</sup>
Astrovírus	Gastroenterite	Alimento marinho <sup>b</sup> , água <sup>c</sup>
Enterovírus	Várias	Água <sup>b</sup>
<b>Bactérias autóctones<sup>a</sup></b>		
<i>Mycobacterium marinum</i>	Granuloma	Água <sup>d</sup>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Infecções de pele	Água <sup>d</sup>
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Alimento marinho <sup>b</sup> , água <sup>c</sup>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gastroenterite e Infec. pele	Alimento marinho <sup>b</sup> , água <sup>d</sup>
<b>Bactérias alóctones<sup>a</sup></b>		
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterite	Água <sup>d</sup>
<i>Leptospira interrogans</i>	Leptospirose	Água <sup>d</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriose	Alimento marinho <sup>b</sup>
<i>Morganella morganii</i>	Intoxicação	Alimento marinho <sup>b</sup>
<i>Salmonella species</i>	Febre tifóide e gastroenterite	Água <sup>c</sup>
<b>Nemátodes</b>		
<i>Anisakis simplex</i>	Anisakiose	Alimento marinho <sup>b</sup>

Fonte: NRC (1996)

<sup>a</sup> autóctone = endêmico ao ecossistema; alóctone = transitório ou alheio ao ecossistema, <sup>b</sup> Crú ou pouco cozido, <sup>c</sup> ingestão acidental de água durante a recreação; água potável contaminada com água de mar ou fezes, <sup>d</sup> contato acidental durante recreação ou trabalho.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

### ***2.1 Ecossistemas aquáticos das zonas costeiras***

Os ecossistemas aquáticos nas zonas costeiras têm uma importância considerável, pois são, a um só tempo, áreas públicas socializadas, onde ocorre relação dos portos marítimos com as cidades, com as paisagens e atividades ocupacionais e recreacionais. Adicionalmente, servem como área de alimentação, berçário, habitat e reprodução de várias espécies, confirmando a necessidade da preservação destes ambientes. As zonas costeiras compreendem as áreas mais produtivas e com maior diversidade biológica do planeta [UNITED NATIONS (U. N., 2008)].

No entanto, frequentemente esses ecossistemas sofrem influência direta da contribuição de água doce e poluição originária do continente. Os ecossistemas aquáticos possuem na sua composição microrganismos autóctones ou nativos, cuja função é específica e microrganismos alóctones (não indígenas) que são provenientes da atividade antrópica do entorno [NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC, 1996)]. As bactérias pelágicas do ambiente marinho podem ser associadas a detritos em suspensão, ao plâncton marinho ou ser de vida livre. Diversos estudos relatam a presença de viroses entéricas humanas e bactérias patogênicas em zonas costeiras (COLWELL, 1978; METCALF, 1978; MELNICK et al., 1979; GRIMES, 1991; BOSCH et al., 2001; KONG et al., 2002).

O Brasil contempla 7.408 km de extensão de linha de costa, desconsiderando os recortes litorâneos (baías, reentrâncias, golfões, etc.), que elevam para mais de 8,5 mil km voltados para o Oceano Atlântico [COMISSÃO NACIONAL INDEPENDENTE SOBRE OS OCEANOS (CNISO, 1998)]. No Brasil, atualmente, cerca de 1/5 da população vive em municípios litorâneos, o que corresponde a cerca de 38 milhões de habitantes, com densidade demográfica em torno de 100 habitantes por km<sup>2</sup> (MORAES, 1995). Segundo dados do censo demográfico de 2000, esses valores determinam uma densidade demográfica de 87 hab/km<sup>2</sup> para a zona costeira, valor cinco vezes superior a densidade média nacional que é de 17 hab/km<sup>2</sup> [(INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE, 2001)].

São imensos os perigos presentes na zona costeira que além de incluírem poluição originária de áreas densamente povoadas, incluem também a entrada de

poluentes provenientes de descargas de rios, descarga de efluentes industriais, derrame de óleo, descarga de água de lastro de embarcações, erosão e aterramento costeiros, desmatamento e instalação de usinas hidrelétricas (EL-SABH et al., 1998). Os estragos causados pelos efeitos negativos de atividades desenvolvidas na costa em ambientes marinhos e costeiros advêm de duas fontes: associados às mudanças econômicas e sociais e aqueles associados à pressão causada pelo excesso populacional sobre os recursos naturais. As mudanças econômicas e sociais em áreas costeiras frequentemente resultam em aumento da pressão da demanda por recursos naturais encontrados em bacias hidrográficas e entre as mesmas. (GESAMP, 2001).

Uma ampla variedade de funções importantes para a sociedade, esclarece a grande ocupação da zona costeira, tais como: a produção de alimentos, a produção de energia, a extração de recursos naturais, a manutenção de habitats de reprodução, a manutenção de rotas migratórias, a garantia da diversidade genética das espécies, a localização para habitação e a prática de recreação, dentre outros (DUBSKY, 1999). No entanto, a sobrevivência das populações costeiras depende da saúde e das condições dos sistemas costeiros, incluindo as áreas úmidas, as regiões estuarinas, as correspondentes bacias de recepção e drenagem, as águas interiores próximas à costa, bem como o próprio sistema marinho. Em suma, a sustentabilidade das atividades antropogênicas nas zonas costeiras depende de um meio marinho saudável e vice-versa (GEO BRASIL, 2002).

Segundo dados da “ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD” (1994), a morte de mais de três milhões de crianças menores de cinco anos que ocorrem por ano são por complicações diarréicas causadas na maioria das vezes por água contaminada, e que o grau de saúde da população pode ser medido pela qualidade do saneamento oferecido à mesma.

De acordo com a Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), são várias as doenças que podem ser causadas ou agravadas pelas más condições de saneamento, drenagem e qualidade da água. De acordo com os dados do GERCO (Gerenciamento Costeiro- MMA), mais de 3.000 toneladas de poluentes líquidos são despejados no litoral brasileiro diariamente e segundo o GEO BRASIL (2002) resultados preliminares indicam que os despejos poluidores estão sendo constituídos principalmente de efluentes industriais e esgotos domésticos.

## **2.2 Gerenciamento das zonas costeiras e desenvolvimento sustentável**

O gerenciamento dos recursos hídricos pode ser traduzido como o instrumento que orienta ao Poder Público e à sociedade, no uso e monitoramento dos recursos ambientais (naturais, econômicos e socioculturais), na área de abrangência de uma bacia hidrográfica, de forma a promover o desenvolvimento sustentável (LANNA, 1995). O principal objetivo, do gerenciamento costeiro é melhorar a qualidade de vida das comunidades humanas que dependem dos recursos costeiros, levando em consideração a manutenção da diversidade biológica e da produtividade dos ecossistemas costeiros (GESAMP, 1996). No Brasil, o gerenciamento costeiro é amparado pela Constituição Federal, que define a zona costeira como propriedade nacional. Neste dispositivo, o Governo Brasileiro instituiu em 16 de maio de 1988 o Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro (PNGC) através da Lei 7.661, como parte integrante da Política Nacional para os Recursos do Mar - PNRM e da Política Nacional do Meio Ambiente – PNMA. A mesma, no artigo 2º, visa especificamente “*orientar a utilização nacional dos recursos na Zona Costeira, de forma a contribuir para elevar a qualidade de vida de sua população, e à proteção do seu patrimônio natural, histórico, étnico e cultural*”.

A Lei 7.661/88 foi regulamentada pelo Decreto-Lei 5.300 de 7 de dezembro de 2004. Nos termos do artigo 6º, seção III, capítulo II, deste decreto ficou estabelecido como objetivos da gestão da zona costeira:

*I - a promoção do ordenamento do uso dos recursos naturais e da ocupação dos espaços costeiros, subsidiando e otimizando a aplicação dos instrumentos de controle e de gestão da zona costeira;*

*II - o estabelecimento do processo de gestão, de forma integrada, descentralizada e participativa, das atividades socioeconômicas na zona costeira, de modo a contribuir para elevar a qualidade de vida de sua população e a proteção de seu patrimônio natural, histórico, étnico e cultural;*

*III - a incorporação da dimensão ambiental nas políticas setoriais voltadas à gestão integrada dos ambientes costeiros e marinhos, compatibilizando-as com o Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro - PNGC;*

*IV - o controle sobre os agentes causadores de poluição ou degradação ambiental que ameacem a qualidade de vida na zona costeira;*

*V - a produção e difusão do conhecimento para o desenvolvimento e aprimoramento das ações de gestão da zona costeira.*



O Brasil dispõe ainda, em relação a programas e projetos específicos para gestão integrada da zona costeira e marinha e aos seus objetivos e metas: o Programa Nacional de Gerenciamento Costeiro (GERCO), o Projeto de Gestão Integrada da Orla Marítima (Projeto ORLA) e o Programa de Avaliação do Potencial Sustentável de Recursos Vivos na Zona Econômica Exclusiva (REVIZEE) (MMA, 2004).

No que se refere à prevenção, o licenciamento ambiental é um dos instrumentos que se atribui a maior importância, pois através deste o órgão licenciador poderá verificar as condições de funcionamento do empreendimento, dando vistas aos outros instrumentos da Política Nacional do Meio Ambiente.

A Resolução Nº 237, de 19 de dezembro de 1997 do CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA dispõe sobre o licenciamento ambiental em seu artigo 1º, inciso I: *“Licenciamento Ambiental: procedimento administrativo pelo qual o órgão ambiental competente licencia a localização, instalação, ampliação e a operação de empreendimentos e atividades utilizadoras de recursos ambientais, consideradas efetiva ou potencialmente poluidoras ou daquelas que, sob qualquer forma, possam causar degradação ambiental, considerando as disposições legais e regulamentares e as normas técnicas aplicáveis ao caso”*. Esta mesma Resolução estabelece em seu Anexo I, sobre ATIVIDADES OU EMPREENDIMENTOS SUJEITAS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL: **Transporte, terminais e depósitos;** ...; marinas, portos e aeroportos, as atividades potencialmente poluidoras e discrimina a atividade portuária como obrigatória de licenciamento.

Ainda no que refere-se aos recursos hídricos, o Brasil dispõe ainda da Lei 9.433, de 8 de janeiro de 1997 da Política Nacional de Recursos Hídricos, que conforme o seu artigo 2º, inciso II, tem como objetivo: *“a utilização racional e integrada dos recursos hídricos, incluindo o transporte aquaviário, com vistas ao desenvolvimento sustentável”*.

Por fim, vale ressaltar que o monitoramento ambiental dos poluentes e da balneabilidade das praias é controlado pela CETESB (Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Básico e de Defesa do Meio Ambiente), com base na *Lei nº 997, de 31 de maio de 1976*, e no Decreto Estadual 8.468, de 8 de setembro de 1976 que aprova o Regulamento da Lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que dispõem sobre a Prevenção e o Controle da Poluição do Meio Ambiente, e pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), com base na Resolução Nº. 274 de 29 de novembro de 2000, visando garantir a qualidade bacteriológica de águas de recreação:

- considerando que a saúde, o bem-estar humano podem ser afetados pelas condições de balneabilidade;

- considerando ser a classificação das águas doces, salobras e salinas essencial à defesa dos níveis de qualidade, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar as condições de balneabilidade;

- considerando a necessidade de serem criados instrumentos para avaliar a evolução da qualidade das águas, em relação aos níveis estabelecidos para a balneabilidade, de forma a assegurar as condições necessárias à recreação de contato primário;

- considerando que a Política Nacional do Meio Ambiente, a Política Nacional de Recursos Hídricos e o Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro (PNGC), recomendam a adoção de sistemáticas de avaliação da qualidade ambiental das águas.

### **2.3 Áreas portuárias brasileiras<sup>1</sup>**

As instalações portuárias possuem uma elevada estrutura, cujos efeitos se estendem em quase todos os subsistemas territoriais: físico-ambiental, econômico-produtivo e urbanorelacional. Por outro lado, a complexidade de seu entendimento e administração, está relacionada ao fato de que o desenvolvimento de suas funções depende de circunstâncias alheias não só ao porto, mas muitas vezes à própria região e ao estado sede (BARRAGAN MUÑOZ, 1995). Llaquet (2002) afirma que independente de sua função como facilitador da economia ao nível macro, o porto, é um gerador de riqueza e de emprego com efeitos positivos na atividade socioeconômica do território regional e, mais diretamente, na cidade portuária. No entanto, o porto se constitui em fator de desenvolvimento para a cidade se for eficiente e, ao mesmo tempo, ambos crescerem em harmonia, na medida em que minimize os impactos causados por suas atividades, segundo alerta Dankfort (1994), “(...) caso contrário, os transtornos se tornam maiores que os benefícios”. Considerando isto, no Brasil, a Resolução CONAMA Nº 237 em seu anexo I, menciona que as atividades portuárias são consideradas como potencialmente poluidoras (BRASIL, 2002).

---

<sup>1</sup> Dados disponíveis no site: [www.transportes.gov.br](http://www.transportes.gov.br) – acessos dia 02/ 10/ 2008 e 07/10/2008.

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

