

ANNA LUIZA BAUER CANELLAS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO
GÊNERO *Vibrio* DAS ÁGUAS DA BAÍA DE GUANABARA, RIO
DE JANEIRO, BRASIL



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2020

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Profa. Dra. Marinella Silva Laport.

CIP - Catalogação na Publicação

BC221i Bauer Canellas, Anna Luiza
Isolamento e caracterização de bactérias do gênero *Vibrio* das águas da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil / Anna Luiza Bauer Canellas. -- Rio de Janeiro, 2020.
150 f.

Orientadora: Marinella Silva Laport.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2020.

1. Baía de Guanabara. 2. identificação. 3. saúde pública. 4. susceptibilidade a antimicrobianos. 5. *Vibrio*. I. Silva Laport, Marinella, orient. II. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO
RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Anna Luiza Bauer Canellas**
DRE: 117155231

BANCA EXAMINADORA: Profa. Ana Paula Vieira Colombo (Presidente)
Profa. Beatriz Meurer Moreira
Dra. Marianne Pataro Mello
Profa. Lúcia Martins Teixeira (Suplente)

Título da Monografia: **“Isolamento e caracterização de bactérias do gênero
Vibrio das águas da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/akp-qzqa-bix>
Data e hora de início: **11 de dezembro de 2020 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

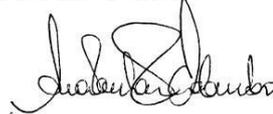
Rio de Janeiro, .11. de ...dezembro. de 2020.

NOTA

Banca Examinadora:

10,0
10,0
10,0

Profa. Ana Paula Vieira Colombo
Profa. Beatriz Meurer Moreira
Dra. Marianne Pataro Mello
Profa. Lúcia Martins Teixeira



Presidente da banca

Prof. Ana Paula Vieira Colombo

Aluno:

Anna Luiza Bauer Canellas

Anna Luiza Bauer Canellas

Orientador:

Marinella da Silva Laport

Prof. Marinella Silva Laport

Coordenador
de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Aos meus avós, Annelise e Gerhard Bauer
(*in memoriam*), duas grandes inspirações.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elisabeth e Nilson, por todo o apoio, ensinamentos, incentivo e compreensão. Obrigada por embarcarem comigo nessa aventura que foi a Microbiologia e por não medirem esforços para que eu pudesse ir atrás do que eu queria. Agradeço toda a preocupação e carinho e, apesar de não podermos estar sempre juntos fisicamente, sei que posso contar com vocês e que vocês sempre podem contar comigo. Esse ano realmente não foi fácil, mas seguimos um dia de cada vez. Espero ainda dar muito orgulho aos dois e retribuir tudo o que fazem por mim.

À minha orientadora Marinella Laport, nem sei como começar a agradecer pelos ensinamentos, conselhos, oportunidades, incentivo e apoio. Muito obrigada por ter me acolhido tão bem desde meu primeiro dia no laboratório e por ter me inserido neste projeto que tenho tanto orgulho de fazer parte. Agradeço toda a confiança, assim como a disponibilidade e paciência para tirar minhas infinitas dúvidas. Sua orientação e seu exemplo são, sem dúvidas, fatores que despertam cada vez mais meu interesse pela Microbiologia e contribuem para minha formação científica e pessoal.

À minha família. Ainda que alguns de nós estejam geograficamente distantes, agradeço toda a confiança que depositam em mim e o incentivo. Um agradecimento especial ao meu primo Gustavo, por tentar me fazer não levar tudo tão a sério, sempre perguntar pelo bem-estar das minhas bactérias e também por ter instalado o Graphpad no meu computador. Sem ele, os gráficos e figuras neste e em outros trabalhos jamais ficariam tão bonitos.

Agradeço aos meus amigos Ariane, Beatriz, Catarina, Helena, Isabelle, Lucas, Mariana Araujo, Mariana Anjo, Nina e Thaís. Muito obrigada pela amizade e incentivo de vocês. Agradecimentos especiais à Mariana Anjo, que está junto comigo desde o jardim de infância. Passamos pela escola e faculdade juntas e agora vamos nos formar (dá para acreditar?!). Obrigada por toda a ajuda, todos os trabalhos que fizemos juntas, por ouvir meus podcasts em formato de áudios e por ter me incentivado a sair do sedentarismo durante a quarentena. À Mariana Araujo, que também está junto comigo desde sempre e foi a primeira a descobrir que eu tinha conseguido passar para a UFRJ. Muito obrigada por sua amizade, otimismo, ajuda e pelas nossas sessões de estudo durante todos esses anos. À Catarina, que me atura até nos momentos mais complicados, que sempre tem os melhores conselhos e que teve a paciência de opinar nos meus primeiros rascunhos da introdução do PTCC. Obrigada por acreditar em mim e me apoiar, mesmo quando eu tenho plena certeza de que tudo vai dar errado. Isabelle, minha

parceira de confeitaria, de coloração de Gram e de espectrofotômetro, obrigada pela amizade desde o início do curso, por todos os bons momentos dentro e fora da faculdade, pelas crises de riso (presenciais e virtuais), pelos momentos compartilhados de surto e por ter me resgatado da Virologia e me trazido para a Bacteriologia. Thaís, minha dupla extensionista, obrigada pela amizade, pelos abraços inesperados durante o dia e por dar seus pulos para ver nosso grupinho feliz. Lucas, obrigada pela sua amizade, incentivo, figurinhas no Whatsapp e pelas várias caronas. Ariane, minha vizinha de laboratório que tem ideias tão doidas quanto as minhas (quando vamos tirar o exército de *E. coli* do papel?) e que várias vezes melhorou o dia do nosso grupinho trazendo suas sobremesas maravilhosas.

Ao professor Walter Oelemann agradeço por toda a ajuda, por ter me incentivado a me candidatar ao *Winterkurs*, por todos os livros (eu leio devagar, mas estou lendo!), pela participação nos nossos seminários do laboratório e pela paciência de conversar comigo em alemão. Vielen Dank!! À professora Márcia Giambiagi pelos ensinamentos e pela infraestrutura de seu laboratório. À professora Dra. Ana Paula Colombo e Dra. Andréa de Freitas pelas contribuições ao texto do meu PTCC. Ao professor Rodolfo Paranhos e sua equipe, que foram responsáveis pela coleta e análises químicas das amostras de água utilizadas neste trabalho. Agradeço também a todos os professores coordenadores do projeto de extensão “Aprender a lavar as mãos previne doenças” por todos os ensinamentos, incentivo e orientação, especialmente neste ano de 2020. Da mesma maneira, agradeço ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e todos os seus professores, que se empenham em nos oferecer um ensino de qualidade em todos os momentos.

Agradeço aos colegas do laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha, Bruno, Gabriela, Gabriel, Jéssyca, Marianna, Thiago e Wellington. Aprendi e continuo aprendendo muito com vocês! Um agradecimento especial ao Bruno, por diversas vezes ter atuado como um “coorientador emprestado”. Muito obrigada por toda a ajuda desde o começo da minha iniciação científica (e até mesmo antes de eu entrar no laboratório), pelo conhecimento compartilhado, pelos seus áudios, pelos momentos de alegria (e de surto também), conselhos, incentivo e, acima de tudo, por ser um exemplo de amigo e cientista.

À minha amiga e aluna Giovanna, por me dar o gostinho de ser professora uma vez na semana e pela compreensão nas semanas que antecederam as defesas do PTCC e TCC. Também agradeço à Rosilda, por toda a ajuda, confiança, incentivo e preocupação. Obrigada por ter

acompanhado minha trajetória (literalmente) durante minha vida toda e pelo apoio em todos os momentos.

Agradeço também a todos os professores que tive durante toda a minha vida escolar, especialmente os de Biologia, cujas aulas foram essenciais para despertar meu interesse pela Ciência desde pequena. Agradeço especialmente ao professor Douglas Guimarães do 3º ano do Ensino Médio, pela dedicação, incentivo e pelas aulas excelentes. Se não fosse por ele, eu não estaria onde estou hoje. Quando recebi minha aprovação depois do processo longo e sofrido do vestibular, prometi a mim mesma que seu nome entraria, sem falta, na minha lista de agradecimentos da monografia. E aqui estamos... mal consigo acreditar que os últimos quatro anos passaram tão rápido.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho, especialmente à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela bolsa de iniciação científica concedida.

“É claro que você irá cometer erros, mas o maior deles seria não tentar”

(Autor desconhecido)

RESUMO

ANNA LUIZA BAUER CANELLAS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Vibrio* DAS ÁGUAS DA BAÍA DE GUANABARA, RIO DE JANEIRO, BRASIL

Orientadora: Marinella Silva Laport

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A Baía de Guanabara (BG) está localizada na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. É considerada um ecossistema estuarino muito poluído utilizado por muitos indivíduos como fonte de recreação e de subsistência, ainda que pouco se saiba a respeito dos riscos que a exposição a essas águas oferece à saúde humana. Ambientes aquáticos são fontes de microrganismos patogênicos e, frequentemente, resistentes a antimicrobianos. Entre estes, destaca-se o gênero *Vibrio*, caracterizado por bactérias gram-negativas e catalase-positivas ubíquas a ambientes marinhos e estuarinos. Certas espécies são patogênicas, causando doenças gastrointestinais associadas à ingestão de alimentos ou água contaminados. Assim, os objetivos do trabalho foram descrever a presença de espécies de *Vibrio* e avaliar sua susceptibilidade aos antimicrobianos partir de amostras de água coletadas em três pontos na BG (próximo à praia da Urca, 1; ponte Rio-Niterói, 7; e à ilha do Fundão, 34), representando níveis crescentes de poluição. Ao longo de um ano (2018 – 2019), 66 amostras de água foram coletadas mensalmente e o isolamento bacteriano foi realizado em ágar TCBS. Colônias presuntivas de *Vibrio* foram selecionadas e purificadas em ágar Marine acrescido de ampicilina (16 µg/mL). A caracterização fenotípica foi conduzida por coloração de Gram e teste da catalase e a identificação, por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS). Avaliou-se também a capacidade de produção de substâncias antimicrobianas contra estirpes de relevância médica. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi analisada por disco-difusão, além da capacidade de produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases. Interações entre a comunidade cultivável de *Vibrio* e fatores ambientais também foram investigadas. A proximidade genética entre bactérias não-susceptíveis aos antimicrobianos das espécies *Vibrio harveyi* e *Vibrio parahaemolyticus* foi avaliada por BOX-PCR. No total, foram isoladas 1.173 bactérias das águas da BG, sendo o ponto 34 aquele com o maior número de bactérias isoladas (831), seguido pelo ponto 7 (175) e 1 (167). Dentre essas, 517 estirpes foram selecionadas e analisadas, das quais 282 foram classificadas como bacilos gram-negativos e 348 como catalase-positivas. Em relação à identificação, 192 estirpes foram identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*. Foram detectadas 20 espécies distintas, entre as quais *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus* foram as mais frequentemente isoladas. Nenhuma estirpe testada foi capaz de produzir substâncias antimicrobianas. Quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, as maiores taxas de resistência foram observadas frente à cefotaxima (18,1%), amicacina (14,0%) e ceftazidima (7,4%). Ademais, 7,2% das estirpes foram classificadas como multirresistentes. Seis estirpes foram produtoras de ESBL, mas a produção de carbapenemases não foi detectada. Em geral, as maiores taxas de isolamento de *Vibrio* spp. ocorreram em meses com maiores temperaturas da água e menores salinidades. As análises de BOX-PCR da espécie *V. harveyi* indicam a presença de grupos clonais que possivelmente permanecem na BG ao

longo do tempo. Em suma, a presença de *Vibrio* spp. resistentes e potencialmente patogênicos nestas águas evidencia um potencial reservatório de resistência a antimicrobianos e os riscos à saúde pública associados à utilização destas águas.

Palavras-chave: Baía de Guanabara, identificação, isolamento, saúde pública, susceptibilidade a antimicrobianos, *Vibrio*.

ABSTRACT**ANNA LUIZA BAUER CANELLAS****ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Vibrio* FROM GUANABARA BAY'S WATERS, RIO DE JANEIRO, BRAZIL****Orientadora: Marinella Silva Laport**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Guanabara Bay (GB) is located in the metropolitan region of the State of Rio de Janeiro. Although considered a very polluted estuarine ecosystem, the GB is frequently used as a recreational and fishing area. However, very little is known about the risks that exposure to these waters poses to human health. Aquatic environments are sources of pathogenic microorganisms, which are often resistant to antimicrobials. Among these, the genus *Vibrio* is characterized by gram-negative and catalase-positive bacteria ubiquitous to marine and estuarine environments. Certain species are pathogenic and may cause gastrointestinal illnesses associated with the ingestion of contaminated food or water. Thus, this study aimed to describe the presence of *Vibrio* species and characterize their antimicrobial susceptibility profile from water samples collected at three points in the GB (1; near GB's entrance, 7; near Rio-Niterói's Bridge and 34; in the proximities of Fundão's island), representing growing levels of pollution. Over a one-year period (2018 – 2019), 66 water samples were collected monthly and bacterial isolation was performed on TCBS agar. Presumptive colonies of *Vibrio* were selected and purified on Marine agar supplemented with ampicillin (16 µg/mL). Phenotypic characterization was carried out by Gram-staining and catalase test, while bacterial identification was determined by mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The ability to produce antimicrobial substances against strains of medical relevance was also evaluated. Susceptibility to antimicrobials was analyzed using disk-diffusion technique and the ability to produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and carbapenemases was also assessed. Interactions between the cultivable *Vibrio* community and environmental parameters were also investigated. Genetic proximity between non-susceptible bacteria belonging to the species *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* was evaluated by BOX-PCR. Overall, 1,173 bacteria were isolated from GB's waters. Site 34 was the one with the highest number of isolated bacteria (831), followed by site 7 (175) and 1 (167). Among these, 517 strains were selected and analyzed, from which 282 were classified as gram-negative bacilli and 348 as catalase-positive. Regarding molecular identification, 192 strains were identified as belonging to the genus *Vibrio*. Twenty different species were detected, among which *V. harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* were the most frequently isolated. No tested strain was considered able to produce antimicrobial substances. Regarding the antimicrobial susceptibility profile, higher resistance percentages were detected to cefotaxime (18.1%), amikacin (14.0%), and ceftazidime (7.4%). Besides, 7.2% of the strains were classified as multidrug-resistant. Six strains were ESBL producers, but carbapenemase production was not detected. Overall, higher *Vibrio* spp. isolation rates occurred in months characterized by higher water temperatures and lower salinities. BOX-PCR results indicated the presence of clonal groups belonging to *V. harveyi* species that are present in the GB throughout the year. Hence, our results indicate the presence of resistant and potentially

pathogenic *Vibrio* spp. in the GB, revealing an antimicrobial resistance reservoir in these waters that could pose a threat to public health.

Key-words: antimicrobial susceptibility, Guanabara Bay, identification, isolation, public health, *Vibrio*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ranqueamento taxonômico de *Vibrio* spp. de acordo com análise do genoma disponível no *Genome Taxonomy Database* (GTDB, 2020). As espécies representadas são consideradas patógenos de seres humanos e de animais marinhos. *indica as espécies mais frequentemente associadas a infecções em seres humanos.....**25**
- Figura 2** – Ágar tiosulfato de sódio, citrato de sódio, bile e sacarose (TCBS). (A) Ágar TCBS (Isifar, Brasil) sem crescimento bacteriano, apresentando sua coloração verde característica. (B) Crescimento bacteriano em ágar TCBS, a partir do qual observam-se colônias amarelas e verdes, de acordo com a ocorrência ou não da fermentação da sacarose.....**30**
- Figura 3** – Fatores de virulência de *Vibrio* spp. Desenho esquemático da rota de infecção por *Vibrio* spp. em humanos em decorrência da ingestão de frutos do mar contaminados. Nesses alimentos, *Vibrio* spp. podem ser encontrados inseridos em biofilmes e serem ingeridos por seres humanos. Uma vez no organismo do hospedeiro, essas bactérias realizam a evasão do sistema imunológico com auxílio da cápsula e utilizam o flagelo para locomoção e persistência. *Vibrio* spp. percorrem o trato gastrointestinal até alcançarem o intestino delgado, onde utilizam pili e sistemas de secreção para iniciar o processo de adesão e colonização do epitélio. Uma vez aderidos, *Vibrio* spp. podem secretar enzimas líticas, hemolisinas, toxinas e sideróforos, que contribuem para a obtenção de nutrientes e desencadeamento da infecção.....**36**
- Figura 4** – Potencial biotecnológico de *Vibrio* spp. Esquema resumindo algumas das principais aplicações biotecnológicas de bactérias do gênero *Vibrio*, especialmente quanto à sua capacidade de produção de enzimas e biossurfactantes e seu potencial antimicrobiano.....**46**
- Figura 5** – Mapa do Brasil (A), destacando o Estado do Rio de Janeiro (B), onde está localizada a Baía de Guanabara, com foco nos municípios que a cercam e os principais rios que nela deságuam (C) [Fonte: ArcGIS National Geographic Map, 2020].....**48**
- Figura 6** – Fluxograma das principais etapas do presente projeto. ¹ BG: Baía de Guanabara; ² SAM: substâncias antimicrobianas; ³ beta-lactamases de espectro estendido; ⁴ BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic-PCR.....**59**
- Figura 7** – Pontos de coleta na Baía de Guanabara. (A) Os três pontos de coleta (1, 7 e 34) estão indicados pelos marcadores cinzas e as distâncias entre eles estão indicadas em quilômetros. Marcadores vermelhos indicam as estações de tratamento de esgoto localizadas ao redor da Baía de Guanabara. (B) Frascos estéreis de 500 mL utilizados nas coletas de água. [Fontes: Google Maps e arquivo pessoal].....**60**
- Figura 8** – (A) Placa de aço polida utilizada para a identificação por MALDI-TOF MS. (B) Bactérias depositadas, em duplicata, nos espaços demarcados da placa metálica (indicadas pela chave).....**63**
- Figura 9** - Distribuição do total de UFCs/mL isoladas em cada ponto de coleta de água na Baía de Guanabara ao longo do período de um ano. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.....**71**

- Figura 10** – Crescimento bacteriano obtido em cada ponto de coleta após cultivo em ágar TCBS durante 24 horas à 25 °C (A: ponto 1 superfície; B: ponto 7 superfície e C: ponto 34 superfície).....72
- Figura 11** - Total de UFCs/mL isoladas em cada expedição de coleta de água na Baía de Guanabara no período entre 2018 e 2019.72
- Figura 12** – Caracterização fenotípica. Resultados obtidos na coloração de Gram (A) e teste da catalase (B).....73
- Figura 13** – Total de bactérias identificadas como *Vibrio* spp. pela metodologia de MALDI-TOF MS em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara, tanto em amostras de águas coletadas da superfície quanto do fundo. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.....75
- Figura 14** – *Heatmap* da distribuição de *Vibrio* spp. nos pontos de coleta na Baía de Guanabara, tanto em amostras oriundas da superfície quanto do fundo. O gradiente de cor indica a escala linear de *Vibrio* spp. identificados por MALDI-TOF MS como a medida da abundância absoluta bacteriana em cada ponto de coleta. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.....76
- Figura 15** – Microrganismos isolados em ágar TCBS e identificados por MALDI-TOF MS como não pertencentes ao gênero *Vibrio*.....77
- Figura 16** – Total de estirpes identificadas por MALDI-TOF MS em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara, tanto da superfície quanto do fundo. Barras azuis indicam as estirpes identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, enquanto as barras amarelas indicam as estirpes identificadas como pertencentes a outros gêneros bacterianos. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.....78
- Figura 17** – Espécies de *Vibrio* spp. identificadas por MALDI-TOF MS em cada expedição e em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara.....80
- Figura 18** – Distribuição de gêneros bacterianos não identificados como pertencentes ao gênero *Vibrio* ao longo do período de um ano na Baía de Guanabara.....81
- Figura 19** – Resultados do teste de SAM. A ausência de halos ao redor das estirpes testadas (crescimento puntiforme, indicado pelas setas) indica que são classificadas como negativas pela metodologia avaliada.....81
- Figura 20** – Susceptibilidade das estirpes de *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi*. AMI: amicacina; CTX: cefotaxima; IPM: imipenem AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; CIP: ciprofloxacina; CAZ: ceftazidima; TET: tetraciclina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim. S – suscetível; I – intermediária; R – resistente.87
- Figura 21** – Distribuição das estirpes multirresistentes em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara, tanto no fundo quanto na superfície. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.....89

Figura 22 – Distribuição dos valores obtidos no cálculo do índice de múltipla-resistência (MAR) nos três pontos de coleta, tanto fundo quanto superfície. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.91

Figura 23 – Exemplo de resultado positivo no teste fenotípico para a avaliação da produção de ESBL por uma estirpe de *V. parahaemolyticus* isolada do ponto 34 na Baía de Guanabara. Setas vermelhas indicam a distorção do halo de inibição, evidenciando o sinergismo entre os antimicrobianos beta-lactâmicos e o inibidor de lactamase. AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; ATM = aztreonam; CAZ = ceftazidima; CPM = cefepime; CRO = ceftriaxona.....92

Figura 24 – Resultados obtidos no teste modificado de Hodge. Em (A) observa-se uma estirpe de *V. alginolyticus* e em (B) uma estirpe de *V. parahaemolyticus*. Em ambas, é possível observar a ausência de crescimento da estirpe de *E. coli* ATCC 25922 em direção ao disco de ertapenem (setas), indicando resultados negativos.94

Figura 25 – Contagem total de *Vibrio* spp. identificados em diferentes faixas de temperatura da água (A), salinidade (B), fósforo total (C), nitrogênio total (D), clorofila (E) e feofitina (F).....100

Figura 26 – Análise em cluster dos padrões de bandas obtidos nas reações de PCR conduzidas com 21 estirpes não-susceptíveis aos antimicrobianos pertencentes à espécie *V. harveyi*. Os percentuais de similaridade estão identificados no dendrograma e foram calculados com base no coeficiente Dice e agrupado pelo método UPMGA.....103

Figura 27 – Análise em cluster dos padrões de bandas obtidos nas reações de PCR conduzidas com 9 estirpes não-susceptíveis aos antimicrobianos pertencentes à espécie *V. parahaemolyticus*. Os percentuais de similaridade estão identificados no dendrograma e foram calculados com base no coeficiente Dice e agrupado pelo método UPMGA.....104

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Principais infecções causadas por <i>Vibrio</i> spp. As quatro principais espécies de <i>Vibrio</i> causadoras de infecções em seres humanos, suas respectivas vias de transmissão, manifestações clínicas e opções de tratamento (adaptado de Baker-Austin <i>et al.</i> , 2018; permissão para uso no anexo XIV).....	37
Quadro 2 – Valores de referência dos <i>scores</i> de identificação utilizados na análise dos resultados obtidos por meio da metodologia de MALDI-TOF MS de acordo com o <i>software</i> Biotyper, versão 3.1 (Bruker Daltonics).....	63
Quadro 3 – Antimicrobianos utilizados para determinação da susceptibilidade de bactérias isoladas das águas da Baía de Guanabara, selecionados de acordo com o CLSI (2010), com suas respectivas siglas, classes, concentrações empregadas e mecanismos de ação.....	66
Tabela 1 – Principais características físico-químicas associadas à Baía de Guanabara e seus respectivos valores médios de acordo com relatos prévios na literatura.....	49
Tabela 2 – Iniciador da reação, sua respectiva sequência nucleotídica e condições de ciclagem utilizadas para as reações de BOX-PCR.....	70
Tabela 3 – Relação entre os <i>scores</i> obtidos pela identificação por MALDI-TOF MS e os pontos de coleta na Baía de Guanabara.....	74
Tabela 4 – Características fenotípicas de seis estirpes não identificadas por MALDI-TOF MS submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	82
Tabela 5 – Susceptibilidade das 193 estirpes avaliadas no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	83
Tabela 6 – Distribuição das estirpes classificadas como não susceptíveis (resistentes e intermediárias) em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara, tanto da superfície quanto do fundo, e as respectivas porcentagens de acordo com o total de estirpes avaliadas em cada ponto de coleta.....	84
Tabela 7 – Susceptibilidade de 149 estirpes identificadas como pertencentes ao gênero <i>Vibrio</i>	85
Tabela 8 – Distribuição das estirpes identificadas como <i>Vibrio</i> e classificadas como não susceptíveis (resistentes e intermediárias) em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara, tanto da superfície quanto do fundo, e as respectivas porcentagens de acordo com o total de estirpes avaliadas em cada local.....	86
Tabela 9 – Susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes identificadas como não pertencentes ao gênero <i>Vibrio</i>	88
Tabela 10 – Estirpes multirresistentes isoladas das águas da Baía de Guanabara, suas respectivas identificações obtidas por MALDI-TOF MS e seus antibiótipos.....	90

Tabela 11 – Estirpes produtoras de ESBL, seus respectivos pontos de isolamento na Baía de Guanabara, identificação obtida por meio da metodologia de MALDI-TOF MS, seus perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e índices de múltipla resistência.....	93
Tabela 12 – Variação, média e desvio-padrão dos fatores ambientais analisados nas águas da Baía de Guanabara no período de junho de 2018 a maio de 2019.....	95
Tabela 13 – Resultados do teste <i>post hoc</i> de Tukey realizado a partir dos valores estatisticamente significativos obtidos na análise de variância ANOVA <i>One-Way</i> referente à variação dos fatores ambientais em cada ponto de coleta.....	97
Tabela 14 – Resultados do teste <i>post hoc</i> de Tukey realizado a partir dos valores estatisticamente significativos obtidos na análise de variância ANOVA <i>One-Way</i> referente à variação dos fatores ambientais em cada expedição de coleta.....	98
Tabela 15 – Correlações estatisticamente significativas detectadas por meio das correlações de Pearson entre a abundância de <i>Vibrio</i> spp. (UFC/mL) e fatores ambientais nos diferentes pontos de coleta.....	101
Tabela 16 – Correlação de Pearson (<i>r</i>) e respectivo <i>p</i> -valor entre a abundância de <i>Vibrio</i> spp. não-susceptíveis e fatores ambientais em quatro meses na Baía de Guanabara.....	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMC	amoxicilina-ácido clavulânico
AMI	amicacina
ANA	Agência Nacional de Águas
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
ATM	aztreonam
BG	Baía de Guanabara
BHI	do inglês, <i>brain heart infusion</i>
BOX-PCR	do inglês, <i>BOX-AIR-based repetitive extragenic palindromic-PCR</i>
CAZ	ceftazidima
CIP	ciprofloxacina
CPM	cefepime
CRO	ceftriaxona
CTX	cefotaxima
CDC	do inglês, <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COVIS	do inglês, <i>Cholera and Other Vibrio Illness Surveillance</i>
ESBL	do inglês, <i>extended-spectrum beta-lactamases</i>
EGM	elementos genéticos móveis
FAO	do inglês, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GTDB	do inglês, <i>Genome Taxonomy Database</i>
ICE	do inglês, <i>integrative conjugative elements</i>
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IPM	imipenem
IRAS	infecções relacionadas à assistência à saúde
MALDI-TOF MS	do inglês, <i>matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry</i>
MAR	do inglês, <i>multiple antibiotic resistance</i>
MDR	do inglês, <i>multidrug resistant</i>
MLST	do inglês, <i>multi-locus sequence typing</i>

NCBI	do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	do inglês, <i>penicillin binding protein</i>
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
SAM	substâncias antimicrobianas
SUT	sulfametoxazol-trimetoprim
TBE	solução de tris, ácido bórico e EDTA
TCBS	meio de cultura tiosulfato, citrato, bile e sacarose
TDH	do inglês, <i>Thermostable Direct Hemolysin</i>
TET	tetraciclina
TRH	do inglês, <i>TDH-Related Hemolysin</i>
UFC	unidades formadoras de colônias
UPGMA	do inglês, <i>unweighted pair group method with arithmetic mean</i>

ÍNDICE

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xvii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xix
1. INTRODUÇÃO	24
1.1. O gênero <i>Vibrio</i>	24
1.1.1. Histórico do gênero	24
1.1.2. Características gerais do gênero <i>Vibrio</i>	25
1.1.3. Identificação de bactérias do gênero <i>Vibrio</i>	27
1.1.4. Influência de fatores ambientais na comunidade de <i>Vibrio</i> spp.	28
1.1.5. Cultivo de bactérias do gênero <i>Vibrio</i>	30
1.1.6. Fatores de virulência e patogenicidade de <i>Vibrio</i> spp.	32
1.1.7. Infecções causadas por <i>Vibrio</i> spp. em seres humanos	36
1.1.8. Infecções causadas por <i>Vibrio</i> spp. em animais marinhos	38
1.1.9. A problemática da resistência aos antimicrobianos e o perfil de susceptibilidade em bactérias do gênero <i>Vibrio</i>	39
1.1.10. Potencial biotecnológico do gênero <i>Vibrio</i>	44
1.2. A Baía de Guanabara	47
1.2.1. Aspectos gerais	47
1.2.2. Impacto ambiental	49
1.2.3. Potenciais riscos à saúde humana	51
1.2.4. Manutenção da qualidade das águas	52

2. JUSTIFICATIVA.....	55
3. OBJETIVOS.....	56
3.1. Objetivos gerais.....	56
3.2. Objetivos específicos.....	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1. Coleta das amostras de água da Baía de Guanabara.....	57
4.2. Isolamento bacteriano a partir de amostras de água da Baía de Guanabara.....	60
4.3. Caracterização fenotípica das bactérias isoladas.....	60
4.4. MALDI-TOF MS.....	62
4.5. Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas.....	63
4.6. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	64
4.6.1. Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos.....	64
4.6.2. Teste fenotípico para avaliação da produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL).....	67
4.6.3. Teste fenotípico para avaliação da produção de carbapenemases (teste de Hodge modificado).....	67
4.7. Avaliação da variação da frequência de espécies de <i>Vibrio</i> em cada ponto de coleta ao longo do período de um ano na Baía de Guanabara.....	68
4.8. Avaliação da influência de fatores ambientais na comunidade cultivável de <i>Vibrio</i> na Baía de Guanabara.....	68
4.9. BOX-PCR.....	69
5. RESULTADOS.....	71
5.1. Isolamento bacteriano em ágar TCBS.....	71
5.2. Caracterização fenotípica.....	73
5.3. Identificação por MALDI-TOF MS.....	73
5.3.1. Total de estirpes identificadas por MALDI-TOF MS.....	73
5.3.2. Identificação de <i>Vibrio</i> spp. por MALDI-TOF MS.....	74

5.3.3. Comparação entre as características morfo-coloniais bacterianas em ágar TCBS e a identificação por MALDI-TOF MS.....	76
5.3.4. Identificação de outros gêneros bacterianos por MALDI-TOF MS.....	77
5.3.5. Distribuição das estirpes identificadas em cada ponto de coleta.....	77
5.3.6. Total de espécies identificadas ao longo do período de um ano.....	79
5.4. Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas (SAM).....	81
5.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	82
5.5.1. Total de estirpes avaliadas.....	82
5.5.2. Susceptibilidade de estirpes do gênero <i>Vibrio</i>	85
5.5.3. Susceptibilidade de outros gêneros bacterianos avaliados.....	87
5.5.4. Multirresistência.....	89
5.5.5. Avaliação da produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL).....	91
5.5.6. Avaliação da produção de carbapenemases.....	94
5.6. Condições ambientais da Baía de Guanabara.....	94
5.7. Influência dos fatores ambientais na comunidade cultivável de <i>Vibrio</i> spp.....	99
5.8. BOX-PCR.....	102
6. DISCUSSÃO.....	105
7. CONCLUSÕES.....	122
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
9. ANEXOS.....	143

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Vibrio*

1.1.1. Histórico do gênero *Vibrio*

Bactérias do gênero *Vibrio* são muito conhecidas por conta da cólera, uma doença causada por *Vibrio cholerae* que já totalizou sete pandemias na História da Humanidade. Atualmente, essa doença persiste principalmente em países em desenvolvimento e estima-se que até 4 milhões de casos ocorram a cada ano, causando em média 21.000 a 143.000 mortes (WHO, 2020). Embora tenham sido primeiramente caracterizadas em 1854 pelo anatomista italiano Filippo Pacini durante um surto da doença em Florença, na Itália, as bactérias do gênero *Vibrio* foram reconhecidas como agentes etiológicos da cólera apenas em 1884 (Bentivoglio e Pacini, 1995). Nesse ano, durante uma expedição científica ao Egito, o médico alemão Robert Koch descreveu mais detalhadamente o microrganismo que isolara, em cultura pura, do epitélio intestinal de pacientes (Howard-Jones, 1984). Ao reportar sua descoberta ao governo alemão, a etiologia da doença foi oficialmente comprovada e aceita (UCLA, 2020).

Ainda em 1854, ao descrever as bactérias até então desconhecidas, Pacini as denominou genericamente como vibriões, sendo esse o primeiro relato de uso do nome para a denominação de tais microrganismos (Hugh, 1964). Desde então, a taxonomia de víbrios vem sendo alvo de diversos estudos e frequentemente sofre alterações (Urbanczyk *et al.*, 2007). Apesar de os primeiros estudos com *Vibrio* spp. terem sido voltados para o contexto clínico, essas bactérias logo ganharam destaque sob a perspectiva ambiental quando pesquisadores demonstraram que as mesmas compõem uma parte significativa das bactérias marinhas cultiváveis em águas costeiras (Colwell, 2006, Zhang *et al.*, 2018). Atualmente, a diversidade de *Vibrio* spp. é amplamente estudada não somente por meio do isolamento bacteriano, mas também por abordagens de biologia molecular, como em estudos metataxonômicos envolvendo o sequenciamento do gene *rrs* (codificador da subunidade ribossomal 16S rRNA), *gyrB* (subunidade B da DNA girase), *pyrH* (uridilato quinase), *rpoD* (fator sigma 70 da RNA-polimerase), *rctB* (proteína de ligação à origem de replicação), *toxR* (ativador transcricional da toxina colérica) e/ou o sequenciamento completo do genoma, permitindo assim, melhor compreensão dos demais membros da família *Vibrionaceae* (Pascual *et al.*, 2010; Urbanczyk, Ogura e Hayashi, 2013; Zhang *et al.*, 2018). Contudo, ressalta-se que, frequentemente, o sequenciamento do gene *rrs* não fornece uma identificação confiável a nível de espécie e

apresenta baixa resolução de discriminação entre espécies taxonomicamente próximas, especialmente estirpes de origem ambiental (não-clínica) (Ki *et al.*, 2009; Erler *et al.*, 2015).

Neste contexto, o gênero *Vibrio* pertence ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacterales (taxonomia GTDB, do inglês, “*Genome Taxonomy Database*”) ou ordem Vibrionales (taxonomia NCBI, do inglês, “*National Center for Biotechnology Information*”) e família Vibrionaceae (**figura 1**). Tal gênero, compreende cerca de 150 espécies (incluindo sinônimos) e 10 subespécies (LPSN, 2020), dentre as quais pelo menos 12 espécies são sabidamente patogênicas a seres humanos, destacando-se *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* (Baker-Austin *et al.*, 2018; Bonnin-Jusserand *et al.*, 2019). Por outro lado, espécies como *Vibrio harveyi* e *Vibrio anguillarum*, são conhecidas como patógenos de animais marinhos, sendo esta última capaz de causar septicemia hemorrágica em peixes, uma doença que acarreta perdas econômicas significativas no setor da aquacultura (Coyle *et al.*, 2020; Xie *et al.*, 2020).

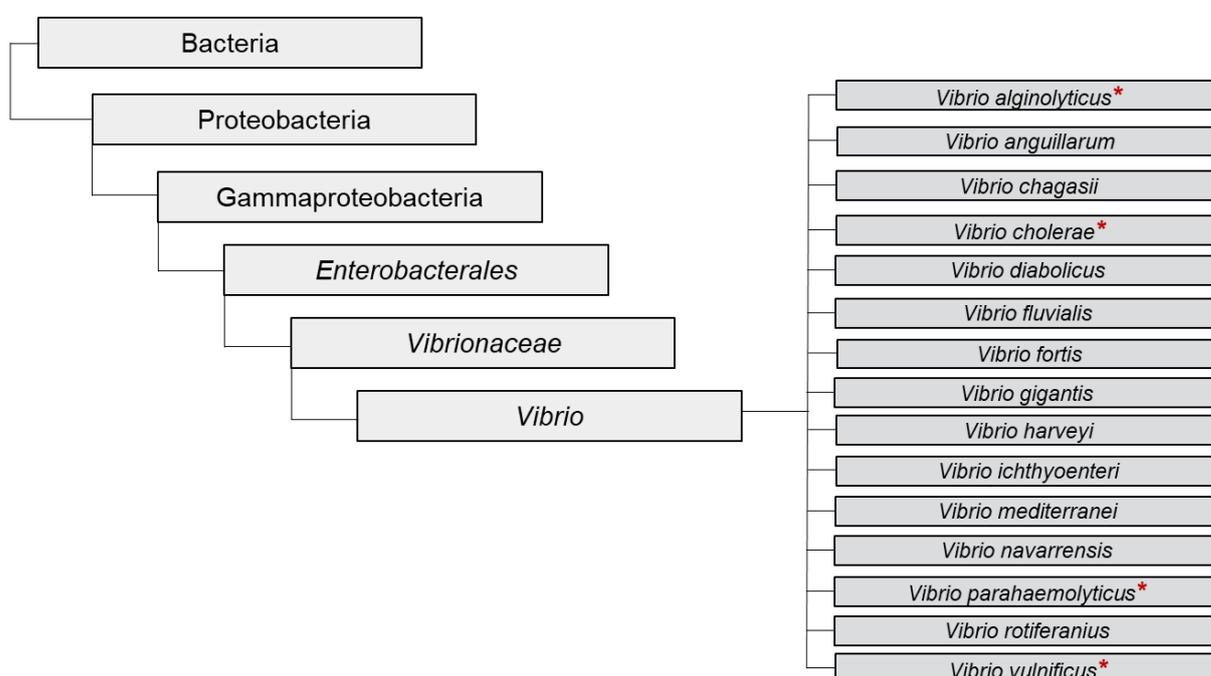


Figura 1 – Ranqueamento taxonômico de *Vibrio* spp. de acordo com análise do genoma disponível no *Genome Taxonomy Database* (GTDB, 2020). As espécies representadas são consideradas patógenos de seres humanos e de animais marinhos.*indica as espécies mais frequentemente associadas a infecções em seres humanos.

1.1.2. Características gerais do gênero *Vibrio*

Membros do gênero *Vibrio* são ubíquos em ambientes marinhos e estuarinos, podendo ser encontrados tanto na forma planctônica, quanto associados a partículas ou outros seres

vivos, como camarões, esponjas e lulas (Yildiz e Visick, 2009; Yano *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018; Freitas-Silva *et al.*, 2020). São caracterizados como bacilos gram-negativos curvos, não formadores de esporos e móveis devido à presença de flagelo polar ou peritríqueo. Apresentam metabolismo fermentativo facultativo e são quimio-organotróficos, sendo capazes de utilizar polissacarídeos (como quitina e ágar), dissacarídeos (como maltose e lactose), monossacarídeos (como D-glicose e D-frutose), entre outros compostos para a obtenção de energia (Farmer *et al.*, 2005). São caracterizados como catalase e oxidase positivos, sendo a ocorrência de oxidação pelo citocromo C, um importante diferencial entre vîbrios e enterobactérias (oxidase-negativas) (Madigan *et al.*, 2010). Ademais, essas bactérias são mesofílicas e majoritariamente halofílicas, apresentando crescimento na faixa de temperatura de 4 a 37 °C e em ambientes com concentração de 1 a 3% de NaCl (Farmer, 1992; Colwell, 2006; Farmer e Hickman-Brenner, 2006).

Em relação às suas características moleculares, o genoma de *Vibrio* spp. é caracterizado, na maioria das espécies, pela presença de dois cromossomos circulares sendo um ligeiramente maior que o outro (Liang *et al.*, 2019). Seu cromossomo maior alberga genes relacionados a atividades essenciais da célula, como replicação e biossíntese da parede celular, bem como genes relacionados à expressão de alguns fatores de virulência, enquanto o menor contém genes acessórios, RNAs não-codificantes e, muito provavelmente, apresenta origem plasmidial (Heidelberg *et al.*, 2000). O motivo pelo qual os cromossomos não se integram ainda não é bem estabelecido, porém acredita-se que este arranjo confira vantagens evolutivas para este gênero bacteriano, que podem refletir nas rápidas taxas de replicação de algumas espécies ou ainda em níveis diferenciados de expressão gênica entre os cromossomos (Yamaichi *et al.*, 1999; Heidelberg *et al.*, 2000; Lukjancenko e Ussery, 2014).

Ademais, elementos genéticos móveis (EGMs) como plasmídeos, integrons, transpósons, prófagos e ilhas genômicas, incluindo as de patogenicidade e metabólicas, podem ser detectados no genoma de *Vibrio* spp. (Verma *et al.*, 2019). Com efeito, estima-se que o genoma destas bactérias seja composto por um genoma cerne (~95%) e por um genoma flexível adquirido (~5%) (Heidelberg *et al.*, 2000; Pant *et al.*, 2020). Por conta disso, eventos de transferência horizontal de genes desempenham um papel importante na aquisição de genes de virulência e de resistência aos antimicrobianos contribuindo, assim, para a melhor adaptação da bactéria ao ambiente no qual está inserida (Baker-Austin *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2019). A título de exemplo, um estudo prévio demonstrou a transferência de genes de resistência à trimetoprim, sulfametoxazol e estreptomicina entre bactérias da espécie *V. cholerae* por meio

de transpósons (Waldor *et al.*, 1996 *apud* Das *et al.*, 2019). Salienta-se também a importância dos elementos conjugativos integrativos (ICEs, do inglês, “*Integrative Conjugative Elements*”), como os da família STX/R391. Esse ICE é encontrado em diversos gêneros bacterianos, incluindo *Vibrio*, e está relacionado à resistência a antimicrobianos e a metais pesados, além de codificar genes de virulência (Gladkikh *et al.*, 2020).

Neste cenário, estudos buscam investigar como a aquisição de ilhas de patogenicidade pode influenciar no surgimento de clones pandêmicos de *Vibrio* spp. (Hurley *et al.*, 2006; Chao *et al.*, 2009). Por conta de suas características moleculares, *Vibrio* spp. considerados não patogênicos podem adquirir EGMs, levando à emergência de estirpes virulentas ou ainda mais virulentas. Desse modo, essas estirpes seriam potenciais reservatórios de genes de resistência e de virulência no meio ambiente, representando um risco à saúde humana (Gennari *et al.*, 2012). Por exemplo, estudos indicam que *V. cholerae* do sorogrupo O139, frequentemente associado a epidemias de cólera, tenha emergido por meio de um evento de transmissão horizontal de genes entre *V. cholerae* não-O1 e *V. cholerae* O1 (Bik *et al.*, 1995; Kopprio *et al.*, 2016). Com efeito, acredita-se que muitos genes de relevância médica tenham sido originados, na verdade, de bactérias não patogênicas (Felis *et al.*, 2020).

1.1.3. Identificação de bactérias do gênero *Vibrio*

No que tange a identificação e diferenciação de *Vibrio* spp., testes bioquímicos são frequentemente empregados, como coloração de Gram, teste da catalase, teste da oxidase, avaliação da fermentação da glicose, entre outros. Testes sorológicos baseados no antígeno O (constituente do lipopolissacarídeo) também podem ser empregados, especialmente no estudo de *V. cholerae*. Esses testes são particularmente importantes para o estudo epidemiológico desta espécie, que conta com mais de 200 sorogrupos, sendo O1 e O139 os associados à cólera (Mandal *et al.*, 2011). Contudo vale ressaltar que, muitas das vezes, ensaios bioquímicos e fenotípicos não são suficientes para a discriminação fidedigna à nível de espécie. Somado a isso, a alta diversidade de *Vibrio* spp. dificulta a identificação precisa de espécies menos frequentemente isoladas.

Assim, técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, “*Polymerase Chain Reaction*”), o sequenciamento total do genoma e a tipagem molecular, como MLST (do inglês, “*Multi-Locus Sequence Typing*”) e BOX-PCR (do inglês, “*BOX-AIR-based repetitive extragenic palindromic-PCR*”), começaram a ser empregadas para a

identificação das estirpes e análises epidemiológicas (Currie *et al.*, 2007). Tais técnicas se mostram de grande valor para vigilância ambiental, especialmente porque *Vibrio* spp. são capazes de permanecer no ambiente em estado “viável, mas não cultivável” como um mecanismo de adaptação, não sendo detectados por métodos convencionais de cultivo, mas sim por estratégias moleculares (Vezzulli *et al.*, 2020).

Ademais, outra técnica que tem se mostrado promissora para a identificação molecular de bactérias desse gênero é a de amplificação isotérmica mediada por Loop (LAMP, do inglês “*Loop-mediated isothermal amplification*”), que a partir da amplificação de genes espécie-específicos, é capaz de distinguir espécies de *Vibrio* com sensibilidade consideravelmente maior que técnicas convencionais de PCR (Kalia *et al.*, 2015). Destaca-se também a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS, do inglês, “*Matrix assisted laser desorption/ionization - Time of flight*”), uma abordagem rápida, menos laboriosa, com boa capacidade de discriminação entre gêneros e espécies e que vem sendo gradativamente mais utilizada na identificação de microrganismos tanto de origem clínica quanto ambiental (Erler *et al.*, 2015; Greig *et al.*, 2018).

1.1.4. Influência de fatores ambientais na comunidade de *Vibrio* spp.

No ambiente aquático, uma série de fatores abióticos podem exercer influência na comunidade de *Vibrio* spp., entre os quais a temperatura da água e a salinidade são os mais compreendidos (FAO e WHO, 2020). Já foi verificado que o aumento da temperatura e a redução da salinidade levam ao aumento na abundância de *Vibrio* spp., como previamente descrito em estudos na Austrália e na Geórgia, demonstrando-se a preferência deste grupo bacteriano por águas mais quentes (> 15 °C) e com baixa salinidade (< 25 ppt) (Kokashvili *et al.*, 2015; Siboni *et al.*, 2016; Baker-Austin *et al.*, 2016, 2017). Sob essa perspectiva, especula-se que exista uma relação entre o aumento da temperatura e o surgimento de infecções por *Vibrio* spp., destacando-se o fato de que a maior parte dessas infecções tende a ocorrer nos meses de verão, quando a temperatura da água tende a ser mais alta e mais pessoas frequentam ambientes aquáticos (Iwamoto *et al.*, 2010). Contudo, em áreas tropicais, nas quais as temperaturas geralmente se mantêm constantes ao longo do ano, a influência da temperatura da água tende a não ser significativa sobre a abundância de *Vibrio* spp. (FAO e WHO, 2020). Ainda, especificamente no caso do Atlântico Sul, o fenômeno de ressurgência tem influência direta sobre a temperatura da água, principalmente no verão, tornando-as mais frias, podendo

influenciar a modulação da comunidade bacteriana local e resultar em padrões de isolamento que diferem daqueles usualmente relatados na literatura (Silva *et al.*, 2006).

Tendo em vista sua relação com a temperatura e a salinidade, alta responsividade a mudanças ambientais e tempo de geração relativamente curto, especula-se que *Vibrio* spp. possam atuar como indicadores dos efeitos do aquecimento global, especialmente em águas costeiras (Baker-Austin *et al.*, 2016). A título de exemplo, surtos de infecções por estas bactérias têm sido relatados em regiões mais frias ou temperadas, como no Alasca e no Chile, indicando que o aquecimento gradual das águas tem efeito positivo sobre a comunidade bacteriana, levando ao aumento da população de *Vibrio* spp., e, conseqüentemente, aumentando os riscos de infecção (González-Escalona *et al.*, 2005; McLaughlin *et al.*, 2005; Baker-Austin *et al.*, 2017).

Além desses fatores, nutrientes orgânicos, inorgânicos e pigmentos (como por exemplo, clorofila e feofitina) também podem exercer influência na comunidade bacteriana (Takemura, Chien e Polz, 2014). Nitrogênio e fósforo são elementos que, em altas concentrações, indicam a ocorrência de eutrofização (Ryther, Dunston e Dunstan, 2011), ao passo que clorofila e feofitina são importantes para a determinação do estado trófico de corpos d'água, bem como para a indicação do estado da biomassa fitoplanctônica (CETESB, 2014). Em 2012, Oberbeckmann e colaboradores demonstraram uma correlação positiva entre a abundância de *Vibrio* spp. e os níveis de clorofila, temperatura e salinidade nas águas do Mar do Norte, sendo estes possíveis parâmetros-chave na modulação da abundância de *Vibrio* spp. ao longo do ano (Oberbeckmann *et al.*, 2012). Um estudo mais recente na Baía de Guanabara, localizada no Estado do Rio de Janeiro, revelou que a comunidade de *Vibrio* spp. apresentava correlações significativas com as concentrações de nitrogênio e fósforo, mas que estas não teriam tanto valor preditivo na abundância bacteriana quanto a temperatura da água e salinidade (Coutinho *et al.*, 2019).

Diversos estudos ao redor do mundo buscam estabelecer correlações entre *Vibrio* spp. e diversos fatores ambientais. No entanto, é importante destacar que estas são muito dinâmicas, visto que variam principalmente em função da localidade, período do ano e também da espécie analisada (Takemura, Chien e Polz, 2014). Sendo assim, em virtude da profusão de fatores que podem interferir com a comunidade de *Vibrio* spp., o estudo de sua ecologia é considerado de alta complexidade (Zhang *et al.*, 2018).

1.1.5. Cultivo de bactérias do gênero *Vibrio*

Em geral, células de *Vibrio* crescem de forma satisfatória em meios de cultura peptonados, como o meio Marine, e em meios contendo sais biliares (Verón, 1965 *apud* Farmer e Hickman-Brenner, 2006). O ágar tiosulfato de sódio, citrato de sódio, bile e sacarose (TCBS) é seletivo e diferencial para o gênero *Vibrio*, sendo o mais utilizado no isolamento bacteriano a partir de amostras tanto de origem clínica quanto ambiental (Gomez-Gil e Roque, 2006). A seletividade desse meio de cultura se deve à presença de citrato, tiosulfato e bile, compostos que tornam o pH alcalino inibindo, assim, o crescimento de gram-positivos e coliformes. As altas concentrações de sódio (aproximadamente 3,3%) favorecem o crescimento de espécies de *Vibrio*, visto que a maioria é halofílica. Em relação à sacarose, esta é fermentada apenas por algumas espécies, como *V. alginolyticus* e *V. cholerae*. Desse modo, ao ocorrer a fermentação desse açúcar, há a acidificação do meio, fenômeno que leva o indicador de pH (azul de bromotimol) a apresentar coloração amarela. Aquelas bactérias que não realizam tal fermentação apresentam colônias verdes ou azuladas que, por sua vez, podem ser indicativas de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, por exemplo (**figura 2**). Além disso, as bactérias capazes de reduzir o tiosulfato a ácido sulfídrico (H_2S) apresentam colônias negras devido à reação do H_2S com o íon férrico. Colônias típicas de *Vibrio* spp. são circulares, ligeiramente achatadas e apresentam margem contínua (BD Diagnostic Systems, 2003; Zimbro *et al.*, 2009b). Desse modo, a coloração e morfologia das colônias em ágar TCBS podem ser utilizadas para a identificação presuntiva de *Vibrio* spp.

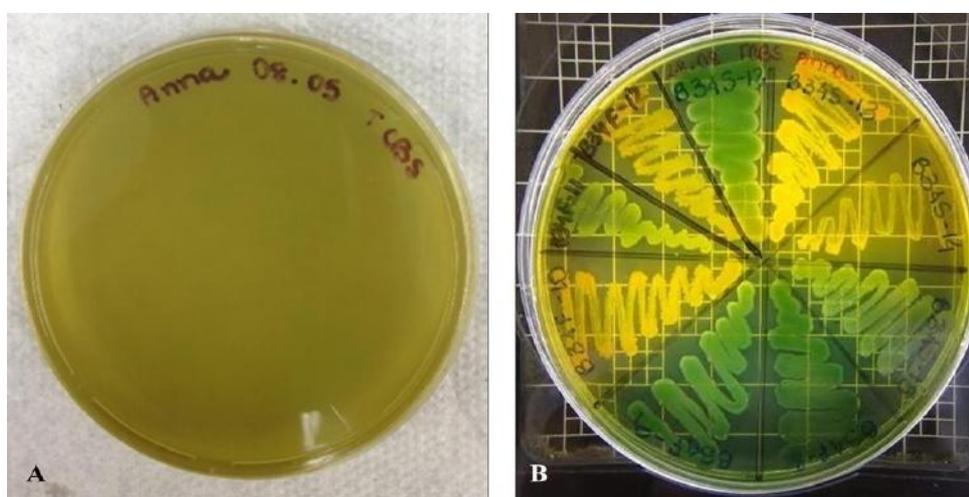


Figura 2 – Ágar tiosulfato de sódio, citrato de sódio, bile e sacarose (TCBS). (A) Ágar TCBS (Isifar, Brasil) sem crescimento bacteriano, apresentando sua coloração verde característica. (B) Crescimento bacteriano em ágar TCBS, a partir do qual observam-se colônias amarelas e verdes, de acordo com a ocorrência ou não da fermentação da sacarose.

Apesar de ser amplamente utilizado como um meio de cultura seletivo para *Vibrio* spp., outras bactérias podem apresentar crescimento em ágar TCBS. De acordo com as instruções do fabricante, os gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Proteus* e *Enterococcus* são inibidos parcialmente e, em caso de crescimento, podem apresentar colônias com características facilmente confundíveis com as de *Vibrio* spp. Estudos anteriores já demonstraram que não necessariamente todas as colônias apresentando crescimento em ágar TCBS são pertencentes ao gênero *Vibrio* (Pfeffer e Oliver, 2003; Jahid *et al.*, 2018). A título de exemplo, o isolamento de bactérias do gênero *Photobacterium* não é incomum em ágar TCBS, especialmente em virtude do fato de que esse gênero é pertencente à família *Vibrionaceae* (Dikow e Smith, 2013). Ademais, outros gêneros como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia* e *Shewanella* também foram previamente descritos na literatura como capazes de crescer em ágar TCBS (Lotz, Tamplin e Rodrick, 1983; Thompson, Austin e Swings, 2006; Korun, Akgun-Dar e Yazici, 2009).

Destaca-se também o meio de cultivo cromogênico CHROMagar™ *Vibrio*. Inicialmente desenvolvido para isolamento de *V. parahaemolyticus* a partir de amostras de alimentos marinhos possivelmente contaminados, CHROMagar™ *Vibrio* seleciona e diferencia bactérias do gênero *Vibrio* de forma mais eficiente que o meio TCBS, atribuindo cores diferentes as principais espécies patogênicas: colônias incolores são indicativas de *V. alginolyticus*, colônias roxas indicam a presença de estirpes de *V. parahaemolyticus* e colônias azuis indicam a presença de *V. cholerae* ou *V. vulnificus* (Hara-Kudo *et al.*, 2001). Além disso, este meio permite a diferenciação de espécies que, em ágar TCBS apresentariam a mesma coloração, como *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, ambas não fermentadoras de sacarose. Uma outra vantagem deste meio de cultura em relação ao ágar TCBS é sua melhor capacidade de recuperação de *Vibrio* spp., fato que resulta em menores probabilidades de resultados falso-positivos (CHROMAGAR™, 2019).

O meio Marine, também conhecido como Zobell Marine 2216, é classificado como um meio de cultura não seletivo utilizado para o cultivo de uma miríade de bactérias marinhas heterotróficas, pois a sua composição mimetiza a da água do mar (Zimbro *et al.*, 2009a). Dessa forma, ao passo que a maioria das espécies de *Vibrio* cresce de forma satisfatória nesse meio, o crescimento concomitantemente de outros microrganismos pode ocorrer (Farmer e Hickman-Brenner, 2006). Consequentemente, tal meio de cultivo não é indicado para o isolamento de víbrios, mas pode ser utilizado para estoque e cultivo posterior ao isolamento.

1.1.6. Fatores de virulência e patogenicidade de *Vibrio* spp.

No que concerne a patogenicidade de *Vibrio* spp., esta está intimamente relacionada a determinados fatores de virulência, que são de suma importância na colonização, estabelecimento do microrganismo e posterior desencadeamento da infecção no hospedeiro. Alguns dos principais fatores de virulência empregados por estas bactérias estão representados na **figura 3**. Vale ressaltar que *Vibrio* spp. não são patógenos invasores. Estas bactérias colonizam o sítio de infecção, aumentam sua densidade celular e secretam enzimas e toxinas que, por sua vez, são as responsáveis pelo desencadeamento da infecção e dano tecidual. Quando o tecido é danificado, as bactérias ganham acesso à corrente sanguínea e podem atingir outros sítios do hospedeiro. Ao fazê-lo, podem eventualmente desencadear quadros de fascite necrosante, celulite bacteriana, choque e septicemia, que frequentemente levam o paciente à morte (Hendren, Sukumar e Glazer, 2017).

Entre alguns dos fatores de virulência mais importantes notabiliza-se o flagelo, cuja flagelina A desempenha papel significativo na persistência de estirpes de *V. anguillarum* em infecções sistêmicas, além de ser vital para seu deslocamento no ambiente aquático (Frans *et al.*, 2011). Ressalta-se também a importância da cápsula polissacarídica, que auxilia na evasão do sistema imunológico do hospedeiro prevenindo, assim, a fagocitose do microrganismo (Kado *et al.*, 2019).

Para a adesão e colonização no sítio de infecção, como por exemplo o epitélio intestinal de seres humanos, *Vibrio* spp. utilizam principalmente pili e sistemas de secreção (Li *et al.*, 2019a; Montánchez e Karbedin, 2020). Sistemas de secreção são estruturas multiproteicas, cuja função está relacionada à entrega de fatores de virulência diretamente no citoplasma da célula do hospedeiro, levando à modificação de vias de sinalização e favorecendo à colonização e persistência do patógeno (Matlawska-Wasowska *et al.*, 2010). Por exemplo, o sistema de secreção do tipo VI (T6SS), frequentemente descrito em *V. cholerae*, pode ser encontrado em bactérias de origem ambiental e clínica. Esse sistema se destaca por conferir à bactéria capacidade de adesão a células eucarióticas, mas seus alvos podem ser tanto células eucarióticas quanto procarióticas (O'Boyle e Boyd, 2014). A presença de T6SS também está associada à citotoxicidade e formação de biofilme. Em virtude de não necessitar de receptores específicos na célula alvo, a bactéria dotada de T6SS é capaz de atacar uma miríade de espécies bacterianas, sendo, portanto, uma vantagem evolutiva para seu estabelecimento em biofilmes mistos (Zheng *et al.*, 2011; Toska, Ho e Mekalanos, 2018). Além disso, a presença de T6SS já

foi relacionada ao rompimento da homeostase da microbiota intestinal do hospedeiro (Logan *et al.*, 2018).

Outros fatores de virulência incluem os sideróforos. Estas são moléculas essenciais para a aquisição de ferro pela bactéria, um nutriente escasso no ambiente aquático e imprescindível para a sua sobrevivência. Estudos indicam que as concentrações de ferro podem modular a expressão gênica em estirpes de *V. parahaemolyticus*. A título de exemplo, um estudo realizado em 2010 demonstrou que baixas concentrações de ferro e altas concentrações de cálcio (condições que se assemelham ao ambiente aquático) podem promover a transcrição de sistema de secreção do tipo III (T3SS), contribuindo assim para a patogenicidade bacteriana (Gode-Potratz *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2019a). Interessantemente, indivíduos com doenças hepáticas, como cirrose, tendem a ser mais suscetíveis a infecções causadas por *V. vulnificus*. Isso se deve ao fato de que estas doenças estão relacionadas à maior concentração de ferro sérico, o que facilita o estabelecimento e disseminação do patógeno no organismo do hospedeiro (Baker-Austin *et al.*, 2018).

Ainda, hemolisinas são importantes fatores de virulência, como a hemolisina termoestável direta (TDH, do inglês, “*Thermostable Direct Hemolysin*”) e a hemolisina relacionada à TDH (TRH, do inglês, “*TDH-Related Hemolysin*”) em estirpes de *V. parahaemolyticus*. TDH é uma toxina enterotóxica que confere à bactéria a capacidade de lisar eritrócitos por meio da formação de poros na membrana, desencadeando o processo apoptótico na célula-alvo. Além disso, essa toxina também está associada a alteração do fluxo de íons em células intestinais, desencadeando diarreia no hospedeiro. A presença do gene codificador da TRH (*trh*) é considerada geneticamente interligada ao gene *ure*, codificador de urease. Essa enzima, por sua vez, é responsável pela hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono e, no contexto da infecção por *V. parahaemolyticus*, inibe a secreção de muco pelo epitélio intestinal (Shimohata e Takahashi, 2010). Tal inibição ocorre por meio da alteração do processo de biossíntese do muco, possivelmente pelo dano de proteínas e lipídios que conferem estabilidade estrutural, ou pelo aumento da taxa de renovação epitelial, não permitindo o tempo necessário para sua síntese. Assim, com a secreção de muco comprometida, a colonização do epitélio do hospedeiro pelo patógeno e a formação de úlceras é facilitada. Tanto TDH quanto TRH são toxinas frequentemente encontradas em bactérias oriundas de espécimes clínicos, porém estima-se que apenas 1–2% das bactérias de origem ambiental apresentem esses fatores de virulência (Miyamoto *et al.*, 1969; Kelly e Stroh, 1988; Iida *et al.*, 1997; Honda e Iida, 1993 *apud* Gopal *et al.*, 2005; Sidebotham e Baron, 1990 *apud* Silveira *et al.*, 2016; Jiang *et al.*,

2019). Além das hemolisinas, a secreção de enzimas como proteinases, lipases, quitinases é bem descrita em membros do gênero *Vibrio* e também contribuem para a adesão, colonização e destruição tecidual do hospedeiro (Montánchez e Karbedin, 2020).

Já em relação à espécie *V. cholerae*, a colonização do epitélio intestinal é mediada principalmente pelo pili co-regulado com a toxina (Tcp), um pilus do tipo IV. Uma vez aderida ao epitélio, a bactéria secreta a toxina colérica, codificada pelos genes *ctxA* e *ctxB* (Praja e Rosalina, 2018). Ambos os genes estão localizados em uma região do genoma denominada CTX ϕ , que é oriunda de um fago lisogênico, evidenciando a importância dos eventos de transferência horizontal de genes para a patogenicidade desse grupo bacteriano (Pant *et al.*, 2020). O mecanismo de atuação da toxina se fundamenta no aumento da concentração intracelular de AMP cíclico (AMPc), fenômeno que acarreta um desequilíbrio eletrolítico caracterizado pela menor absorção de íons de sódio e o efluxo de íons cloreto pelas células intestinais. Dessa maneira, altera-se a tendência absorptiva do intestino para uma função secretória, ou seja, a água tende a fluir para fora das células em direção ao lúmen do intestino, causando uma perda expressiva de líquidos que culmina em diarreia e vômitos, fenômenos capazes de levar o paciente à rapidamente morte por desidratação (Bharati e Ganguly, 2011). Outro aspecto importante referente à patogenicidade de *V. cholerae* é a sua motilidade, um fator importante para a formação de biofilme e para a persistência na infecção (Silveira *et al.*, 2016).

Além desses fatores de virulência, víbrios também são conhecidos por sua capacidade de produzir biofilme. Em biofilmes, as células bacterianas estão embebidas em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, composta por exopolissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA extracelular, formando uma estrutura complexa, que fornece aos microrganismos que a compõe maior tolerância ao estresse ambiental em comparação às células planctônicas (Abe, Nomura e Suzuki, 2020; Muhammad *et al.*, 2020). Em vista disso, estudos demonstram que bactérias inseridas em biofilmes são menos susceptíveis à ação de antimicrobianos, desinfetantes e predadores (Montánchez e Kaberdin, 2020). Em se tratando de *Vibrio* spp., biofilmes são de suma importância para a colonização do hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento da infecção (Yildiz e Visick, 2009). Biofilmes podem se formar em superfícies bióticas, como por exemplo no exoesqueleto de animais marinhos, e abióticas, como próteses e cateteres (Muhammad *et al.*, 2020). Ademais, estudos recentes indicam que biofilmes são ambientes favoráveis à ocorrência de transferência horizontal de genes, fenômeno frequentemente associado ao desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (Abe, Nomura e Suzuki, 2020). Visto que algumas espécies de *Vibrio* são patogênicas a animais

marinhos, a formação de biofilme representa uma grave ameaça à saúde desses animais e também ao setor da aquacultura, provocando perdas econômicas significativas, além de representar um risco à saúde dos consumidores (Arunkumar *et al.*, 2020).

Um fator importante no controle da patogenicidade em *Vibrio* spp. é o *quorum sensing*, um mecanismo de sinalização baseado na densidade celular. Esta comunicação se dá pela resposta das células a diferentes concentrações de moléculas sinalizadoras, que são proporcionais à densidade celular bacteriana (Mukherjee e Bassler, 2019). Curiosamente, o fenômeno de *quorum sensing* foi primeiramente descrito em bactérias do gênero *Vibrio* (*Vibrio fischeri* e *V. harveyi*, ambas consideradas espécies bioluminescentes) no ano de 1979, nas quais observou-se que, em maiores densidades celulares, o acúmulo de moléculas sinalizadoras era suficiente para a indução de bioluminescência (Nealson e Hastings, 1979). O fenômeno de *quorum sensing* está presente na maioria das espécies de *Vibrio* e está relacionado à formação de biofilme, à secreção de toxinas e enzimas e à motilidade, além da bioluminescência propriamente dita. Aqui é válido ressaltar que determinadas moléculas sinalizadoras são sensíveis a alterações na temperatura e no pH, dois elementos importantes no cenário das mudanças climáticas. Neste contexto, as águas oceânicas tendem a se tornar mais aquecidas, ácidas e menos salinas, podendo contribuir para a alteração da dinâmica da comunidade de *Vibrio* spp. e favorecer a ocorrência de infecções (Montánchez e Kaberdin, 2020). Como exemplo, cita-se um estudo realizado em 2012, que demonstrou que o aumento da temperatura poderia levar ao aumento da expressão de fatores de virulência e moléculas associadas ao *quorum sensing* em estirpes de *Vibrio coralliilyticus*, um importante patógeno de corais (Kimes *et al.*, 2012).

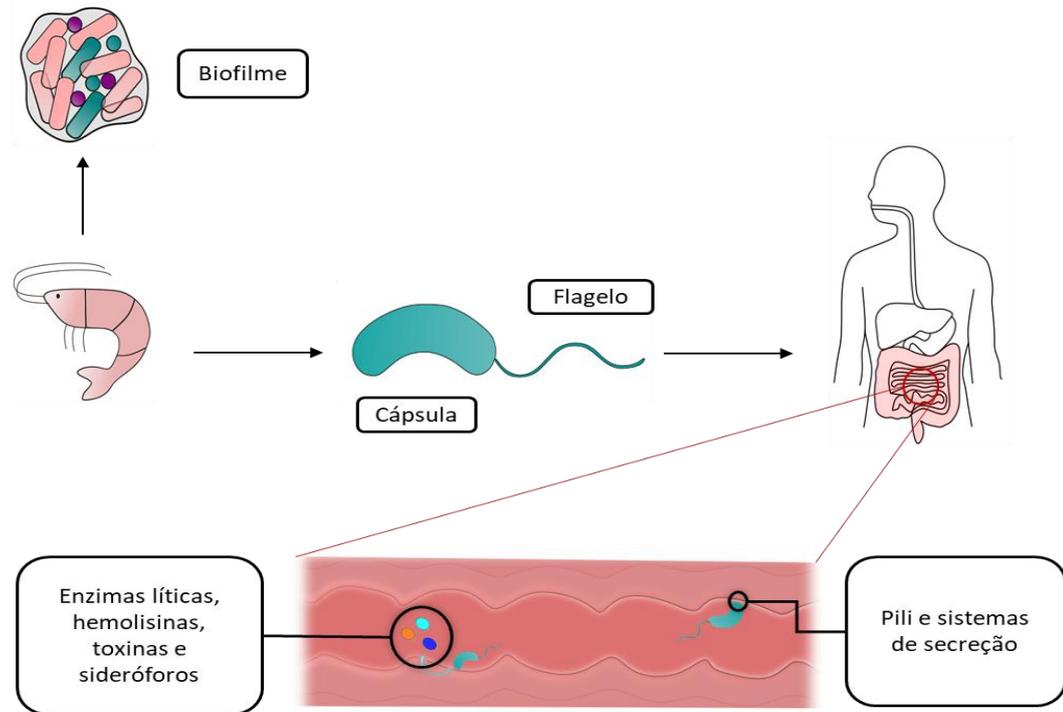


Figura 3 – Fatores de virulência de *Vibrio* spp. Desenho esquemático da rota de infecção por *Vibrio* spp. em humanos em decorrência da ingestão de frutos do mar contaminados. Nesses alimentos, *Vibrio* spp. podem ser encontrados inseridos em biofilmes e serem ingeridos por seres humanos. Uma vez no organismo do hospedeiro, essas bactérias realizam a evasão do sistema imunológico com auxílio da cápsula e utilizam o flagelo para locomoção e persistência. *Vibrio* spp. percorrem o trato gastrointestinal até alcançarem o intestino delgado, onde utilizam pili e sistemas de secreção para iniciar o processo de adesão e colonização do epitélio. Uma vez aderidos, *Vibrio* spp. podem secretar enzimas líticas, hemolisinas, toxinas e sideróforos, que contribuem para a obtenção de nutrientes e desencadeamento da infecção.

1.1.7. Infecções causadas por *Vibrio* spp. em seres humanos

Estima-se que 12 espécies do gênero *Vibrio* sejam patogênicas ao homem, causando infecções relacionadas à ingestão de frutos do mar crus ou mal cozidos e ao consumo ou contato com água contaminada (CDC, 2019). Nesse sentido, as espécies mais associadas a infecções em humanos são *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (**Quadro 1**). Em relação à espécie *V. cholerae*, os sorogrupos O1 e O139 são os responsáveis pela cólera (diarreia grave), mas outros sorogrupos podem acarretar quadros de gastroenterite e infecção de ferimentos (Baker-Austin *et al.*, 2018).

Quadro 1 – Principais infecções causadas por *Vibrio* spp. As quatro principais espécies de *Vibrio* causadoras de infecções em seres humanos, suas respectivas vias de transmissão, manifestações clínicas e opções de tratamento (adaptado de Baker-Austin *et al.*, 2018; permissão para uso no anexo XIV)

Espécie	Transmissão	Manifestações clínicas	Tratamento
<i>V. alginolyticus</i>	Exposição à água contaminada	Infecções de olhos e ouvido, raramente causa sepse	Administração de doxiciclina
<i>V. cholerae</i> *	Ingestão de água ou alimentos contaminados; transmissão pessoa a pessoa	Sorogrupos O1 e O139: cólera (diarreia grave)	Reidratação oral, administração de antimicrobianos, como azitromicina e ciprofloxacina
		Outros sorogrupos: gastroenterite, infecção de ferimentos	Administração de ciprofloxacina, doxiciclina ou cefalosporinas de 3ª geração em casos graves
<i>V. parahaemolyticus</i>	Ingestão de água ou frutos do mar contaminados; exposição à água contaminada	Gastroenterite, infecção de ferimentos, sepse, fascite necrosante	Reidratação oral Administração de doxiciclina, quinolonas ou cefalosporinas de 3ª geração em casos graves
<i>V. vulnificus</i>			Em casos de fascite necrosante, é necessário desbridamento cirúrgico Administração de doxiciclina ou cefalosporinas de 3ª geração

*vacinas disponíveis: Dukoral®, Shanchol™ e Euvichol®.

A dose infecciosa varia de acordo com a espécie. Apesar de estudos dessa natureza não serem mais permitidos atualmente, de acordo com uma revisão publicada em 2001, foi proposto que a dose infecciosa para *V. cholerae* poderia ser de apenas 1.000 células. No caso de *V. parahaemolyticus*, esse valor poderia ser de 10^6 células (Kothary e Babu, 2001; FAO e WHO, 2020). O tempo de incubação da infecção também depende da espécie, podendo variar de horas até uma semana (Meise, Ferrand e Grewe, 2015).

Quanto à epidemiologia, esta é uma área que ainda carece de informações a nível global, visto que infecções causadas por *Vibrio* spp. não são notificáveis em todos os países e também devido à ausência de sistemas de vigilância epidemiológica internacionais (Baker-Austin *et al.*, 2018). Ainda assim, estima-se que, anualmente, 80.000 infecções sejam causadas por *Vibrio* spp. nos Estados Unidos apenas (CDC, 2019). Neste país, há o serviço de informação para cólera e outros vibrios (COVIS, do inglês, “*Cholera and Other Vibrio Information Service*”), que desde 1988 recolhe informações epidemiológicas sistematicamente, sendo as vibrioses doenças passivas de notificação desde o ano de 2007 (Baker-Austin *et al.*, 2018). Em contrapartida, no cenário brasileiro, o monitoramento epidemiológico de *Vibrio* spp. é direcionado à detecção e notificação de infecções por *V. cholerae*, tornando a investigação da

ocorrência de infecções por outras espécies mais difícil (Ministério da Saúde, 2005; 2015). Soma-se a isso o fato de muitas infecções de etiologia idiopática com quadros clínicos similares aos causados por *Vibrio* spp. não serem investigadas ou reportadas, resultando em um cenário carente de informações epidemiológicas mais completas.

1.1.8. Infecções causadas por *Vibrio* spp. em animais marinhos

Vibrio spp. também são notórios patógenos de animais marinhos. Entre as espécies mais associadas a infecções estão *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *V. anguillarum*. Em peixes, frequentemente são descritos relatos de septicemia hemorrágica, uma doença causada por *V. anguillarum* (Toranzo, Margariños e Romalde, 2005). Já em camarões, diversas infecções são associadas ao patógeno *V. harveyi*, como por exemplo a vibriose luminescente, lesões oculares e a doença da cauda branca. Além dessas doenças, a invasão de ovos e larvas é frequente, fato que tem como consequência a interrupção do desenvolvimento do animal. *V. harveyi* também é capaz de causar infecções em ostras, pepinos-do-mar e peixes e é um patógeno oportunista de seres humanos (Montánchez e Kaberdin, 2020). Por outro lado, *V. parahaemolyticus* é uma espécie comumente associada à necrose hepatopancreática aguda em camarões (Li *et al.*, 2017).

Infecções causadas por *Vibrio* spp. em animais estão entre as mais frequentemente relatadas em sistemas de aquacultura. Geralmente, acarretam altas taxas de mortalidade de animais, gerando perdas econômicas significativas que podem ser estimadas em milhões de dólares ao ano (Novriadi, 2016; Arunkumar *et al.*, 2020). Em países como a Índia, onde a aquacultura representa um dos principais pilares da economia, prejuízos neste setor representam um grave problema econômico. Soma-se a isso o fato de que diversos países empregam antimicrobianos em sistemas de aquacultura como uma medida de prevenir e tratar infecções (Arunkumar *et al.*, 2020). Tal fato contribui para o desenvolvimento e disseminação de resistência nestes ambientes, o que tende a tornar o tratamento de infecções cada vez mais difícil e oneroso. Assim, evidencia-se a problemática da resistência não só como uma ameaça à saúde humana e de animais, mas também à economia.

1.1.9. A problemática da resistência aos antimicrobianos e a susceptibilidade em bactérias do gênero *Vibrio*

Antimicrobianos são substâncias amplamente empregadas no tratamento e profilaxia de infecções em seres humanos e animais. Sua descoberta representou um grande avanço para a Medicina, visto que permitiu o tratamento de infecções antes tidas como não tratáveis, e consequentemente, possibilitou a realização mais segura de uma miríade de procedimentos médicos, como cirurgias, transplante de órgãos, entre outros (Marston *et al.*, 2016). Contudo, a intensificação do uso destas substâncias gera uma forte pressão seletiva sob a qual bactérias capazes de expressar mecanismos de resistência ou persistência apresentam vantagens adaptativas em relação às bactérias sensíveis (Jung, Ryu e Kim, 2019). Assim, o fenômeno da resistência aos antimicrobianos é resultante das complexas interações entre as bactérias, seus genes e seus elementos genéticos móveis, e catalisada pela intensa pressão seletiva imposta pelos seres humanos. Com efeito, o rápido aparecimento e disseminação de microrganismos resistentes observado nas últimas décadas é um dos exemplos mais claros de evolução por seleção decorrente da influência antropogênica. Nesse âmbito, o sucesso adaptativo dos determinantes de resistência, ou seja, sua capacidade de fixação na população bacteriana, está intrinsecamente associado à seleção antropogênica como resultado da tentativa de controle dos microrganismos pelo uso de antimicrobianos (Gillings, Paulsen e Tetu, 2017).

Atualmente, a resistência microbiana é considerada um dos maiores desafios do século XXI. A rápida emergência de patógenos multirresistentes, extensivamente resistentes e pan-resistentes encarece e dificulta, ou até mesmo impossibilita, o tratamento de infecções com antimicrobianos convencionais. Soma-se a isso, as taxas relativamente lentas de descoberta e desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas e terapias (Frieri, Kumar e Boutin, 2017). Consequentemente, estima-se que 700.000 mortes ocorram todos os anos em decorrência de infecções por patógenos resistentes e que este número possa alcançar a marca de 10 milhões até o ano de 2050 caso as taxas de resistência microbiana não subsidiem (Willyard, 2017).

A problemática da resistência aos antimicrobianos é amplamente investigada sob a perspectiva clínica. Todavia, cada vez mais evidências corroboram para a percepção do meio ambiente como um agente crucial na emergência e disseminação de resistência. Nesse panorama, destacam-se os ambientes aquáticos, especialmente as regiões costeiras, que são frequentemente classificados como reservatórios de bactérias resistentes e também de genes de

resistência aos antimicrobianos (Dewi, Götz e Thomas, 2020). Além disso, ressalta-se o notável papel do meio ambiente como fonte de novos fenótipos de relevância clínica, não apenas aqueles relacionados à resistência, mas também fenótipos envolvidos com mecanismos de virulência e patogenicidade (Ghaly *et al.*, 2019). Apesar de sua importância, a percepção dos ecossistemas como agentes tão importantes quanto o ambiente clínico para a emergência, evolução e disseminação de resistência é frequentemente subestimada, sobretudo em ambientes aquáticos (Coutinho *et al.*, 2013; Fresia *et al.*, 2019). Como efeito, tem-se um cenário carente de informações mais completas acerca desta temática sob a perspectiva ambiental, tornando imprescindível o desenvolvimento e o estímulo de pesquisas neste âmbito. Dado que os ecossistemas aquáticos são importantes fontes de subsistência e recreação para a população, questiona-se quais riscos estes podem oferecer aos seres humanos e animais. Nesse sentido, a análise de águas recreacionais poderia ser ampliada de modo a contemplar as questões da resistência aos antimicrobianos e patogenicidade, áreas que ainda permanecem pouco exploradas no cenário brasileiro (Montezzi, 2014).

Considerando a importância de membros do gênero *Vibrio* como patógenos de humanos e animais, o estudo de seu perfil de resistência aos antimicrobianos ganha cada vez destaque na comunidade científica. O fato destas bactérias serem dotadas de uma notável plasticidade genômica é um dos principais fatores que contribuem para sua adaptação ao ambiente e para a resistência à pressão seletiva imposta pela presença de antimicrobianos e outros agentes (Das *et al.*, 2019). No entanto, ressalta-se a importância dos antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por *Vibrio* spp., para as quais geralmente recomenda-se a administração de aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, sulfonamidas e tetraciclina, assim como as combinações de amoxicilina e ácido clavulânico e de trimetoprim e sulfametoxazol (Jang *et al.*, 2014; Ehlamdi, da Silva e Parveen, 2016; Baker-Austin *et al.*, 2018).

Em geral, *Vibrio* spp. tendem a serem sensíveis a maioria dos antimicrobianos utilizados na medicina humana e veterinária (Shaw *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2018). Contudo, diversos estudos na literatura relatam altas taxas de resistência a amino e carboxipenicilinas por determinadas espécies, notoriamente *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* (Vaseeharan *et al.*, 2005; Bier *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2018; Lei *et al.*, 2020). Nesse sentido, estima-se que desde o ano de 1999, as taxas de resistência à ampicilina apresentadas por *V. cholerae* variem de 75 a 100% (Chatterjee *et al.*, 2020). A observação desse fenômeno está associada à presença de genes codificadores de beta-lactamase nos cromossomos de *Vibrio* spp., como é o caso do

gene *bla*_{CARB-17}, localizado no cromossomo 2 de *V. parahaemolyticus* e dos genes *bla*_{CARB-6}, *bla*_{CARB-7} e *bla*_{CARB-9} encontrados em estirpes de *V. cholerae* não-O1 e não-O139 (Devi *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2014; Chiou, Li e Chen, 2015; Lee *et al.*, 2018, Zago *et al.*, 2020b). A presença do gene *bla*_{CARB-17} no cromossomo de *V. parahaemolyticus*, somado ao fato de que este não se encontra em uma ilha genômica ou próximo de integrons ou transpósons, sugere que a resistência às penicilinas seja intrínseca nessas bactérias (Chiou, Li e Chen, 2015).

Aminoglicosídeos como amicacina e gentamicina são utilizados no tratamento de infecções por *Vibrio* spp. (Baker-Austin *et al.*, 2018). Estas substâncias podem ser naturais ou semissintéticas, apresentam amplo espectro de ação e seu funcionamento consiste na inibição da síntese proteica bacteriana (Krause *et al.*, 2016). Entre os mecanismos de resistência a aminoglicosídeos detectados em bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*, destacam-se a expressão de bombas de efluxo, que realizam o efluxo ativo da substância, e a expressão de enzimas modificadoras do antimicrobiano, que podem catalisar reações de acetilação e fosforilação (Das *et al.*, 2019). Ressalta-se também o fato de que esta classe de antimicrobianos é amplamente empregada em sistemas de aquacultura, especialmente na Ásia, sendo esta uma região na qual observa-se um considerável aumento nas taxas de *Vibrio* spp. resistentes ao longo dos anos (Loo *et al.*, 2020).

Beta-lactâmicos são antimicrobianos amplamente empregados no tratamento de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e em infecções adquiridas na comunidade. Esta classe inclui cefalosporinas, penicilinas, carbapenemas, monobactâmicos e inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) e todos estes grupos compartilham uma característica em comum: a presença do anel beta-lactâmico (Romano *et al.*, 2016). Cefalosporinas de terceira geração, como por exemplo cefotaxima e ceftazidima, são utilizadas no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas que apresentam resistência à primeira e segunda gerações de cefalosporinas e são frequentemente empregadas no tratamento de infecções por *Vibrio* spp., apesar de pesquisas recentes indicarem crescentes taxas de resistência a estas substâncias (Baker-Austin, 2018, Bui e Preuss, 2020; Zago *et al.*, 2020a, 2020b). Carbapenemas, por sua vez, geralmente são utilizados como última escolha no tratamento de infecções bacterianas e a resistência a esta subclasse é um fenômeno preocupante, visto que esse fenótipo geralmente implica na resistência a maioria dos outros antimicrobianos disponíveis (Nordmann, 2011; Lu *et al.*, 2014; Bier *et al.*, 2015; Zago *et al.*, 2020a). Quanto ao seu mecanismo de ação, beta-lactâmicos inibem a síntese do peptidoglicano, um componente essencial da parede celular bacteriana. Ao se ligarem de forma irreversível às proteínas de

ligação à penicilina (PBP, do inglês “*penicillin-binding proteins*”), a formação das cadeias peptídicas do peptidoglicano é impedida e sua estrutura final fica comprometida, levando à lise celular (Pandey e Cascella, 2020). No que tange o gênero *Vibrio*, a presença de genes de resistência como *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX} e *bla*_{NDM-1}, assim como a expressão de bombas de efluxo e a produção de beta-lactamases de espectro estendido e de carbapenemases já foram descritas (Chowdhury, 2016; Das *et al.*, 2019). A presença de genes de resistência a beta-lactâmicos em *Vibrio* spp. já foi associada à presença de integrons e elementos genéticos móveis, novamente evidenciando o importante papel da transferência horizontal de genes para a aquisição e disseminação de determinantes de resistência, não somente no contexto clínico, mas também no contexto ambiental (Yen *et al.*, 2020).

Fluoroquinolonas, por sua vez, são substâncias sintéticas utilizadas no tratamento de infecções causadas por uma miríade de bactérias e estima-se que representem 7% do consumo total de antimicrobianos na medicina humana, o que pode contribuir consideravelmente para o desenvolvimento de resistência (Felis *et al.*, 2020). Seu mecanismo de ação consiste na inibição de enzimas essenciais para a replicação do DNA: DNA girase e topoisomerase IV (Naeem *et al.*, 2016). Genes que conferem resistência à quinolonas (*qnr*) estão presentes nos cromossomos de diversas espécies da família *Vibrionaceae*, mas a resistência a estes antimicrobianos também pode ser mediada por plasmídios, contribuindo assim, para sua disseminação no ambiente (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2016). A resistência também pode se dar por mutações pontuais nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parE* e *parC*, que são os codificadores das enzimas-alvo do antimicrobiano (Das *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019).

Tetraciclinas também são uma classe de antimicrobianos frequentemente empregada no tratamento de infecções por *Vibrio*, especialmente doxiciclina e a tetraciclina propriamente dita (Baker-Austin *et al.*, 2018). Estas substâncias atuam inibindo a síntese proteica bacteriana e alguns dos mecanismos de resistência mais frequentes incluem a expressão de bombas de efluxo, proteção ribossomal e alteração do alvo do antimicrobiano (Sheykhsaran *et al.*, 2019). Em estirpes de *Vibrio*, a presença dos genes de resistência a tetraciclinas *tetA* e *tetB* já foi descrita e também já foi associada à presença de plasmídeos (Han *et al.*, 2015; Faja *et al.*, 2019).

As sulfonamidas foram a primeira classe de antimicrobianos sintéticos com potencial para uso sistêmico (Sköld, 2000). Entre estes agentes antimicrobianos, sulfametoxazol é frequentemente empregado em associação à trimetoprim e ambos atuam interferindo na síntese de ácido fólico bacteriana, um composto essencial para a síntese e reparo do DNA (Eliopoulos

e Huovinen, 2001). Apesar desta combinação ser recomendada para o tratamento de infecções por *Vibrio* spp., ressaltam-se as crescentes taxas de resistência detectadas em bactérias pertencentes a este gênero. A título de exemplo, genes de resistência à sulfametoxazol, trimetoprim e estreptomicina são frequentemente detectados em ICEs pertencentes à família SXT/R391, assim como também podem ser detectados em plasmídeos, novamente reforçando a pertinência da transferência horizontal de genes para a aquisição e disseminação de fenótipos de resistência (Burrus *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2019).

Vale ressaltar ainda que a detecção de *Vibrio* spp. multirresistentes vem sendo cada vez mais descrita em diversos países. Um estudo realizado na Nigéria relatou que estirpes de *Vibrio* isoladas de efluentes oriundos de abatedouros de animais apresentavam resistência a até 12 antimicrobianos, com índices de múltipla resistência de até 0,63 (Odjadjare e Igbinsa, 2017). O índice de múltipla resistência é calculado pela razão entre o número de antimicrobianos aos quais uma estirpe foi considerada não-susceptível e o número de antimicrobianos aos quais foi exposta nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. Ressalta-se aqui que valores maiores ou iguais a 0,2 são considerados preocupantes, visto que indicam possíveis fontes de contaminação por antimicrobianos no ambiente (Jiang *et al.*, 2014). Em 2018, Zhao e colaboradores demonstraram que 61,4% das estirpes de *V. parahaemolyticus* isoladas de camarões de aquaculturas chinesas foram consideradas multirresistentes, das quais 10,5% apresentavam o gene de virulência *tdh* (Zhao *et al.*, 2018). Ademais, um estudo realizado na Sibéria demonstrou que estirpes de *V. cholerae* responsáveis por um surto de cólera na região apresentavam resistência fenotípica a até nove antimicrobianos (incluindo aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamidas, cloranfenicol, quinolonas e nitrofuranos), apresentando também uma série de genes de resistência (Gladkikh *et al.*, 2020). Nesse contexto, alguns antimicrobianos são considerados como os últimos recursos no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, como é o caso da colistina, uma substância pertencente à classe das polimixinas. A resistência à colistina é considerada preocupante, visto que este é um antimicrobiano empregado inclusive no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes à carbapenemas (Sun *et al.*, 2018). Contudo, um estudo recente realizado na China demonstrou a presença de uma estirpe de *V. parahaemolyticus* virulenta carregando o gene codificador da resistência à colistina (*mcr-1*) em plasmídios, indicando a possibilidade de disseminação horizontal desse fenótipo (Lei *et al.*, 2020).

Nessa conjuntura, as crescentes taxas de resistência aliadas à diminuição das taxas de descoberta de novas substâncias contribuem para o agravamento da problemática da resistência

aos antimicrobianos, que vem se tornando um dos maiores desafios no âmbito da saúde pública mundial atualmente (Kraemer, Ramachandran e Perron, 2019). Todavia, ainda que muito investigado sob o ponto de vista clínico, o panorama da resistência é frequentemente subestimado, ou mesmo negligenciado, sob a perspectiva ambiental, sobretudo em ambientes marinhos (Coutinho *et al.*, 2013). Atualmente, esses dados tornam-se ainda mais pertinentes sob o contexto do conceito de Saúde Única (*One Health*), (CDC, 2018). Nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde define o conceito de Saúde Única como uma estratégia para a elaboração e implementação de medidas em colaboração com diversos setores (especialmente as áreas relacionadas à segurança alimentar, ao controle de zoonoses e ao combate à resistência aos antimicrobianos), objetivando ampliar benefícios à saúde pública (WHO, 2017b). Sendo assim, estudos voltados para a compreensão do papel de bactérias ambientais como fontes de genes de resistência, bem como para a avaliação da transferência horizontal desses genes no ambiente, tornam-se cada vez mais pertinentes.

1.1.10. Potencial biotecnológico do gênero *Vibrio*

Apesar de contar com algumas espécies patogênicas, o gênero *Vibrio* possui um interessante leque de aplicações biotecnológicas (**figura 4**). Por conta das rápidas taxas de replicação e metabolismo versátil, o potencial biotecnológico de *Vibrio* spp. vem sendo cada vez mais reconhecido e estudado a fim de se otimizar processos industriais (Hoffart *et al.*, 2017). *Vibrio natrie gens*, por exemplo, é considerada uma bactéria com uma das mais rápidas taxas de replicação conhecidas (inferiores a 10 minutos) e capaz de metabolizar uma miríade de substratos. Além disso, esta espécie é geneticamente manipulável e é considerada taxonomicamente distante de espécies de *Vibrio* patogênicas sendo, portanto, uma das mais promissoras bactérias no campo da biotecnologia, com o potencial de ser uma alternativa ao uso de estirpes de *Escherichia coli* como hospedeiro de clonagem e expressão gênica (Weinstock *et al.*, 2016). A título de exemplo, esta espécie apresenta uma das maiores taxas de tolerância ao selênio, um composto tóxico para diversas espécies bacterianas e um contaminante comum de solos (Hoff *et al.*, 2020). *V. natrie gens* é capaz de metabolizar este composto em nanopartículas de selênio, que por sua vez apresentam um vasto potencial de aplicações no setor de eletrônicos, cosméticos e também na medicina, como agentes dotados de propriedades antioxidantes e antitumorais. Nesse sentido, diversos estudos buscam investigar o

potencial de biorremediação de *V. natriegens* e também sua capacidade de produção de partículas com alto valor agregado (Ali *et al.*, 2013; Fernández-Llamosas *et al.*, 2017).

O potencial antimicrobiano de membros do gênero *Vibrio* também é uma área promissora. A capacidade de *Vibrio* spp. de inibir estirpes de *E. coli* oriundas de fezes animais e estirpes clínicas de *Streptococcus pneumoniae*, já indicava o potencial inibitório dessas bactérias tanto contra patógenos gram-negativos quanto gram-positivos (Towse, 2005). Estudos mais recentes demonstraram especialmente o potencial inibitório de estirpes de *Vibrio* isoladas de esponjas marinhas (Santos-Gandelman *et al.*, 2014; Laport, 2017). Cita-se como exemplo, uma estirpe de *Vibrio* isolada da espécie de esponja *Darwinella* (classe Demospongiae) no litoral do Rio de Janeiro, apresentando atividade inibitória contra uma estirpe multirresistente de *Citrobacter freundii* (Freitas-Silva *et al.*, 2020). Um outro trabalho recém-publicado evidenciou a atividade antibacteriana e antifúngica de uma estirpe de *Vibrio* isolada da esponja marinha *Suberea mollis*, com a identificação química de metabólitos capazes até de promover o crescimento vegetal (Bibi *et al.*, 2020).

Além disso, vale mencionar também a produção de biossurfactantes por espécies desse gênero. Biossurfactantes são substâncias tensoativas que apresentam aplicações como agentes emulsificantes, dispersantes e antiespumantes. No entanto, este é um viés pouco explorado no gênero *Vibrio*, muito possivelmente por conta do potencial patogênico de membros deste grupo. Ainda assim, estudos apontam que biossurfactantes oriundos de *Vibrio* spp. podem apresentar efeito significativo na redução da formação de biofilme e *quorum sensing* de membros do próprio gênero, como foi o caso de uma pesquisa realizada na Índia, que demonstrou o potencial biotecnológico de *V. natriegens* no combate a estirpes de *V. harveyi*, um importante patógeno animal (Kannan *et al.*, 2019). Assim, a aplicação de biossurfactantes oriundos de estirpes de *Vibrio* poderia ser uma medida para o controle de infecções por este gênero no setor da aquicultura, sendo uma alternativa para a redução de prejuízos econômicos.

Estudos também investigam a capacidade de produção de enzimas por estirpes de *Vibrio*, como agarases, amilases, proteases, celulasas, colagenases e quitinases (Burgess, 2006; Hassanshahian, 2014; He *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). Essas substâncias são de alto valor econômico, visto que podem ser aplicadas em diversas áreas no setor industrial. Celulasas, por exemplo, podem ser empregadas na indústria têxtil e na hidrólise de resíduos agroindustriais (De Castro e Pereira, 2010). Como outro exemplo de aplicação biotecnológica, cita-se a degradação da quitina por quitinases bacterianas. A quitina é um dos polímeros mais abundantes, especialmente no ambiente marinho, sendo comumente encontrada em

exoesqueletos de crustáceos e notável por sua recalcitrância. Com o aumento da atividade pesqueira, a concentração de quitina no meio ambiente aumentou significativamente, tornando-se um resíduo de difícil manejo. Desse modo, esse seria um campo de aplicação de quitinases oriundas de *Vibrio* spp. (Ohishi *et al.*, 1996; Xaxiri *et al.*, 2018; He *et al.*, 2020).

A capacidade de degradação de resíduos plásticos também é uma área que vem sendo alvo de diversos estudos em todo o mundo. Nesse sentido, estirpes de *Vibrio* já foram descritas como capazes de se aderir a superfícies de microplásticos e de degradar resíduos de filmes plásticos compostos pela mistura de álcool polivinílico e polietileno de baixa densidade (PVA-LLDPE), indicando uma potencial aplicação na área de biorremediação ou ainda no manejo de resíduos sólidos (Raghul *et al.*, 2014, Kirstein *et al.*, 2016).

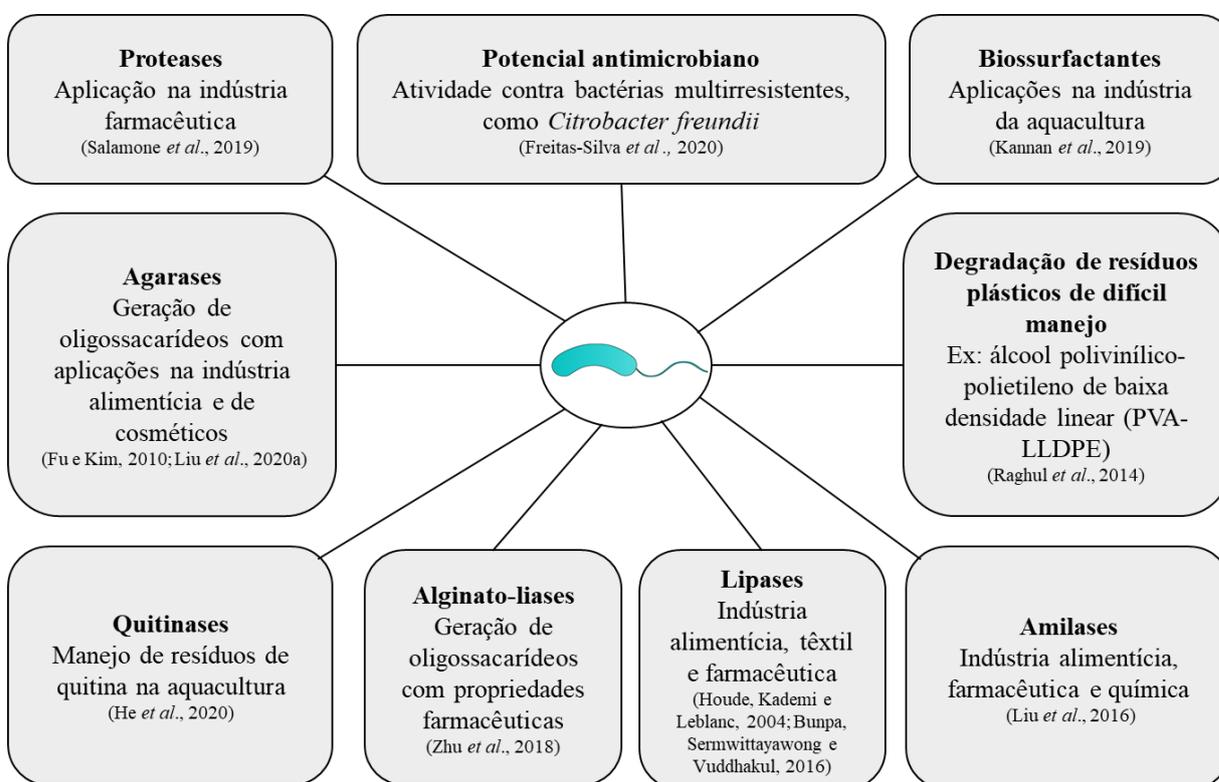


Figura 4 – Potencial biotecnológico de *Vibrio* spp. Esquema resumindo algumas das principais aplicações biotecnológicas de bactérias do gênero *Vibrio*, especialmente quanto à sua capacidade de produção de enzimas e biossurfactantes e seu potencial antimicrobiano.

1.2. A Baía de Guanabara

1.2.1. Aspectos gerais

A Baía de Guanabara (**figura 5**) é uma baía oceânica com área estimada de 380 km² localizada na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, região Sudeste do Brasil (INEA, 2020b). De norte a sul apresenta 30 quilômetros de extensão e, de leste a oeste, 28 quilômetros, comportando um volume de cerca de $1,87 \times 10^9$ m³ de água (Kjerfve *et al.*, 1997; Fistarol *et al.*, 2015; Soares-Gomes *et al.*, 2016). Existem 22 ilhas e 44 praias na região, que são frequentadas durante todo o ano por moradores e turistas, o que contribui para a consolidação da Baía de Guanabara como um dos principais centros recreativos e de atividades náuticas do Brasil e uma importante atração turística para a cidade do Rio de Janeiro (Instituto Baía de Guanabara, 2015). Em contrapartida, a Bacia Hidrográfica da Baía de Guanabara apresenta área de 4.081 km² e atende de forma total ou parcial 16 municípios: Belford Roxo, Cachoeira de Macacu, Duque de Caxias, Guapimirim, Itaboraí, Magé, Mesquita, Nilópolis, Niterói, Nova Iguaçu, Petrópolis, Rio Bonito, Rio de Janeiro, São Gonçalo, São João de Meriti e Tanguá. Além disso, 50 rios e córregos têm as águas da Baía de Guanabara como destino final. Dessa maneira, tal bacia hidrográfica é considerada um importante recurso hídrico para a região (Oliveira *et al.*, 2014).

O clima local é classificado como tropical úmido, marcado por temporadas mais secas (junho – agosto, inverno austral) e mais úmidas (dezembro – março, verão austral). Os valores médios de temperatura, salinidade, índice pluviométrico, concentração de clorofila e taxa de renovação das águas na Baía de Guanabara estão representados na **Tabela 1**. Seu regime de marés é classificado como semi-diurno misto o que significa que, a cada dia lunar, há duas marés altas e duas marés baixas de tamanhos diferentes. A média de variação de maré é 0,7 m, com amplitude máxima de 1,4 m e não apresenta variação espacial significativa (Kjerfve *et al.*, 1997; Soares-Gomes *et al.*, 2016; National Ocean Service, 2020). Em algumas regiões e épocas do ano, suas águas são consideradas estratificadas, apresentando diferentes concentrações de oxigênio dissolvido, temperatura e salinidade ao longo da coluna d'água (Mayr *et al.*, 1989; Kjerfve *et al.*, 1997; Seeliger e Kjerfve, 2001; Paranhos *et al.*, 1993 *apud* Fistarol *et al.*, 2015).

Visto que o Oceano Atlântico exerce influência considerável neste sistema estuarino, há a existência de um gradiente de salinidade que se estende desde a área mais externa, que tende a apresentar maior salinidade, até a região mais interna da Baía de Guanabara. Contudo, os níveis de salinidade também são influenciados pela chegada de água dos rios e riachos e pelo

despejo de efluentes (Mayr e Paranhos, 1993). Já em relação a temperatura, observa-se uma tendência oposta à salinidade: as regiões mais externas tendem a apresentar temperaturas mais baixas, enquanto as áreas internas apresentam temperaturas mais altas (Paranhos *et al.*, 1993 *apud* Soares-Gomes *et al.*, 2016; Mayr *et al.*, 1989).

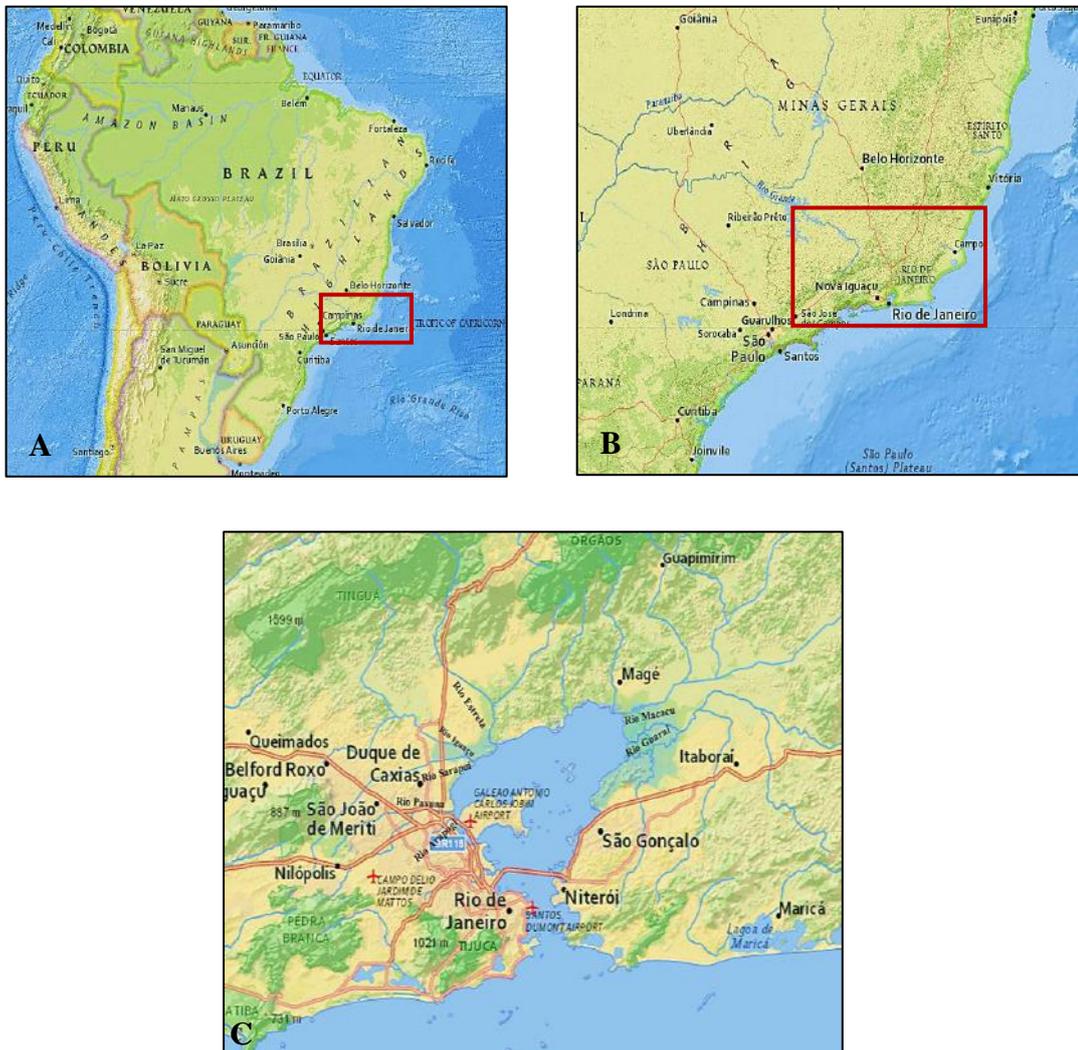


Figura 5 – Mapa do Brasil (A), destacando o Estado do Rio de Janeiro (B), onde está localizada a Baía de Guanabara, com foco nos municípios que a cercam e os principais rios que nela deságuam (C) [Fonte: ArcGIS National Geographic Map, 2020].

Tabela 1 – Principais características físico-químicas associadas à Baía de Guanabara e seus respectivos valores médios de acordo com relatos prévios na literatura

Características	Valores médios	Referências
Temperatura da água	24,2 °C ± 2,6 °C	
Salinidade	13 – 34 S	Kjerfve <i>et al.</i> , 1997; Valentin <i>et al.</i> , 1999; de Carvalho e Neto, 2016; Fistarol <i>et al.</i> , 2015; Soares-Gomes <i>et al.</i> , 2016
Oxigênio dissolvido	7,87 mL/L	
Índice pluviométrico	1.200 – 1.800 mm/ano	
Concentração de clorofila	0 – > 150 mg/m ³	
Taxa de renovação de 50% das águas	11,4 dias	

1.2.2. Impacto ambiental

Desde os primeiros registros da colonização europeia no século XVI, a Baía de Guanabara sofre com intensa ação antropogênica (Soares-Gomes *et al.*, 2016). Ao longo dos séculos, este ecossistema participou de diversos ciclos econômicos brasileiros, atuando como uma importante região portuária. No século XX, iniciou-se no país um processo de intensa urbanização e industrialização que refletiu na expansão desordenada dos centros urbanos, fato que agravou os problemas de saneamento básico da cidade do Rio de Janeiro e, conseqüentemente, as condições hidrológicas da Baía de Guanabara. Atualmente, a região em que se localiza é considerada uma das mais industrializadas do país e uma das mais populosas do mundo (Fistarol *et al.*, 2015; Demographia World Urban Areas, 2019; IBGE, 2019).

A Baía de Guanabara abriga duas refinarias, dois portos, cerca de 16 mil indústrias e diversos estaleiros. Ao seu redor, estima-se que habitem mais de 10 milhões de pessoas, das quais cerca de quatro milhões vivem em situações precárias de urbanização e saneamento básico. De acordo com o Painel de Saneamento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, 33,2% da população não é contemplada com coleta de esgoto apropriada (Instituto Trata Brasil, 2018). Conseqüentemente, os efluentes gerados nesses locais frequentemente têm como destino final as águas da Baía, nas quais estes são despejados *in natura* (Fistarol *et al.*, 2015). Soma-se a isso o fato de que alguns dos rios e córregos que deságuam na Baía de Guanabara percorrem áreas densamente habitadas e são considerados canalizações de esgoto à céu aberto. Estes rios podem receber ainda o despejo de efluentes industriais e lixo contribuindo, assim, para o

processo de assoreamento e eutrofização das águas da Baía de Guanabara (ANA, 2005; Aguiar, Neto e Rangel, 2011). Como outra consequência ressalta-se a presença de metais pesados como mercúrio, cromo, cobre e níquel, notadamente na região interna oeste, nas proximidades da foz dos rios São João de Meriti, Sarapuí e Iguaçu (ANA, 2005).

O despejo de efluentes domésticos representa uma das principais fontes de poluição para a Baía de Guanabara. Apesar de existirem diversas estações de tratamento de esgoto na cidade, a grande parte delas realiza apenas o tratamento primário e poucas apresentam a capacidade de realizar o tratamento secundário (CEDAE, 2020a). Em linhas gerais, o tratamento primário é a primeira etapa no tratamento do esgoto e fundamenta-se na remoção de sólidos grandes e sólidos orgânicos em suspensão. Já o tratamento secundário consiste na degradação biológica, na qual há a decomposição dos sólidos em suspensão e a redução do número de patógenos (Gerba e Pepper, 2015). Ressalta-se que a realização destas etapas pode reduzir a carga de microrganismos patogênicos, mas etapas de desinfecção posteriores são necessárias para o aumento da eficácia deste processo.

Além do despejo de efluentes domésticos, a Baía de Guanabara também recebe efluentes agrícolas, rurais, hospitalares e industriais gerados nos municípios da região metropolitana (Cardoso *et al.*, 2012; Neto *et al.*, 2017). Nessa conjuntura, calcula-se que 18 m³/s de efluentes não tratados sejam lançados diretamente na Baía de Guanabara por dia (Fistarol *et al.*, 2015). Tais efluentes são ricos em matéria orgânica, mas podem conter também metais pesados, resíduos de hidrocarbonetos, pesticidas, óleos e sólidos em suspensão (Kjerfve *et al.*, 1997; Aguiar, Neto e Rangel, 2011; Fistarol *et al.*, 2015). Devido ao excesso de nutrientes, estima-se que a concentração média de clorofila na porção interior da Baía exceda a de 130 µg/L, indicando condições hipereutróficas (Seeliger e Kjerve, 2001). Vale ressaltar ainda que taxas elevadas de nutrientes propiciam a ocorrência de floração de algas e a formação de regiões hipóxicas próximas ao fundo, o que afeta a diversidade e a reciclagem de nutrientes (Conley *et al.*, 2007; Fistarol *et al.*, 2015). Em virtude da presença de portos na região, derramamentos de petróleo e outros produtos químicos durante as operações de carga e descarga não são incomuns e estudos já estimaram que a taxa de poluição por óleo seja de 9,5 toneladas por dia (Mayr *et al.*, 1989; ANA, 2005; Eichler *et al.*, 2014). Ainda que se beneficie do contato com o Oceano Atlântico, que auxilia no trabalho de renovação das águas, nos locais onde a quantidade de contaminantes é alta, esse processo não é eficiente e a qualidade da água é prejudicada. Como resultado, as praias da região também são afetadas, apresentando com frequência baixos índices de balneabilidade (INEA, 2019b).

Sob essa perspectiva, ressalta-se que a ação antropogênica afeta os ambientes aquáticos de diversas maneiras, dentre as quais destacam-se o despejo de esgoto, poluição por plásticos e microplásticos, contaminação por metais pesados, fertilizantes e pesticidas, bem como a introdução de espécies invasoras (como por meio da troca de água de lastro de navios) e o impacto causado pelos sistemas de aquacultura. Com efeito, a influência dos seres humanos no planeta Terra é tão intensa a ponto de ser possível classificar o atual período geológico como a era do Antropoceno. Apesar do papel crucial dos microrganismos nos mais diversos ambientes e processos biogeoquímicos, as consequências da ação antropogênica são frequentemente subestimadas sob a ótica microbiológica (Gillings e Paulsen, 2016). Diante disso, estudos recentes apontam que a era do Antropoceno poderia estar favorecendo o enriquecimento dos ambientes marinhos com patógenos oportunistas, fato que aumenta as probabilidades de interações patógeno–hospedeiro e propicia surtos de doenças que afetam tanto os seres humanos quanto animais marinhos (Jurelevicius *et al.*, 2020).

1.2.3. Potenciais riscos à saúde humana

A mistura de águas oriundas de rios e do Oceano Atlântico e o despejo de uma miríade de efluentes, aliados à influência dos fatores hidrológicos e climáticos, modelam a comunidade microbiana da Baía de Guanabara, tornando-a complexa (Vieira *et al.*, 2008). Visto que uma parte expressiva do esgoto lançado não recebe tratamento prévio, questiona-se os riscos que a exposição a essas águas possa oferecer à saúde humana. Nesse sentido, destaca-se o fato de a Baía de Guanabara ser frequentemente utilizada como uma área recreativa e como fonte de subsistência para moradores. Com efeito, estima-se que existam cerca de 18.000 pescadores registrados em colônias e associações, que frequentemente realizam a pesca de mariscos, camarões e peixes na região, e calcula-se que as atividades de pesca realizadas neste ambiente representem um terço do total do Estado do Rio de Janeiro (Rosa e Mattos, 2010; Instituto Baía de Guanabara, 2015; Bernardes Filho *et al.*, 2019).

Vale ressaltar que os efluentes domésticos frequentemente carregam patógenos, bactérias resistentes a antimicrobianos, bem como resíduos de fármacos que não são eliminados em sua totalidade pelos tratamentos convencionais de esgoto. Assim, ao serem despejados em corpos d'água propiciam a criação de um ambiente com constante pressão seletiva, no qual os microrganismos mais bem adaptados são selecionados (Baquero, Martínez e Cantón, 2008). Sob a perspectiva da problemática da resistência aos antimicrobianos, favorece-se o

surgimento, desenvolvimento e disseminação de resistência no ambiente aquático. Estudos prévios já demonstraram a presença de bactérias como *Aeromonas*, *Acinetobacter* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antimicrobianos nas águas da Baía de Guanabara e em rios que nelas deságuam (Coutinho *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2019). Além disso, um estudo realizado em 2018 demonstrou que determinados rios que deságuam na Baía de Guanabara apresentam níveis elevados de *E. coli* e coprostanol¹, ambos indicadores de contaminação fecal no ambiente (Costa, Pessoa e da Silva Carreira, 2018).

Em 2013, uma pesquisa realizada pelo Instituto Trata Brasil revelou que 2.745 internações por doenças gastrointestinais foram realizadas nos municípios no entorno da Baía de Guanabara (Instituto Trata Brasil, 2017). Já em 2018, dados divulgados por este mesmo Instituto relatam que 1.223 internações foram notificadas devido a doenças de veiculação hídrica e 892 por diarreia na região metropolitana do Rio de Janeiro (Instituto Trata Brasil, 2018). Nesse mesmo ano, 32 óbitos foram registrados em decorrência de doenças de veiculação hídrica. Com isso, estima-se que mais de dois milhões de reais tenham sido gastos com internações dessa natureza apenas em 2018. Por conta do fato de mais de 4 milhões de habitantes viverem em moradias irregulares na cidade do Rio de Janeiro, não contempladas com serviços de saneamento básico, doenças de veiculação hídrica assumem grande importância e são um problema de saúde pública (Fries *et al.*, 2019). Assim, questiona-se a influência das águas da Baía de Guanabara nos casos de infecções gastrointestinais na região metropolitana do Rio de Janeiro, ressaltando a importância dessa investigação frente à problemática da resistência aos antimicrobianos, que tende a tornar o tratamento de infecções cada vez mais difícil e oneroso.

1.2.4. Manutenção da qualidade das águas

Atualmente, a qualidade de corpos hídricos é determinada de acordo com as resoluções 274/2000 e 357/2005 do CONAMA, as quais dispõem sobre a balneabilidade e qualidade das águas naturais, respectivamente. Na resolução 274/200, constam os padrões microbiológicos para o uso recreativo e contato primário de corpos d'água, enquanto na resolução 357/2005 é

¹ (5 β -cholestan-3 β -ol), um esteroide de 27 carbonos formado a partir da bio-hidrogenação do colesterol por bactérias localizadas no trato intestinal de humanos e em vertebrados superiores. No ambiente, apresenta boa resistência à degradação química e biológica e tende a se acumular em sedimentos. Sendo assim, este é um composto frequentemente utilizado como um biomarcador de contaminação fecal no ambiente (Rada *et al.*, 2016).

possível encontrar os parâmetros físico-químicos para estes ambientes, como por exemplo valores máximos estabelecidos para substâncias orgânicas e inorgânicas.

Tendo em vista as diretrizes da resolução 357/2005 do CONAMA, o Instituto Estadual do Ambiente (INEA) realiza o monitoramento contínuo e sistemático de corpos d'água no estado do Rio de Janeiro, o qual já conta com 321 pontos de amostragem, tanto em rios e baías, quanto em lagoas e outros reservatórios. Para tal, é aplicado o Índice de Qualidade da Água NSF (IQA_{NSF}), que compila em um único valor os resultados dos seguintes parâmetros: oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, fósforo total, nitrato, pH, turbidez, sólidos dissolvidos totais, temperatura tanto do ar quanto da água e coliformes termotolerantes. De acordo com os resultados obtidos por essa metodologia, as águas podem ser classificadas como: excelente ($100 \geq IQA \geq 90$), boa ($90 > IQA \geq 70$), média ($70 > IQA \geq 50$), ruim ($50 > IQA \geq 25$) ou muito ruim ($25 > IQA \geq 0$). Os resultados das análises realizadas são divulgados em boletins, os quais podem ser acessados em: <http://www.inea.rj.gov.br/ar-agua-e-solo/como-e-feito-o-monitoramento-das-aguas-interiores/>.

Segundo o último boletim de qualidade das águas da região hidrográfica da Baía de Guanabara, publicado em novembro de 2019, nenhuma das 52 estações de amostragem em rios que compõem essa bacia obtiveram classificação “excelente” ao longo desse ano (INEA, 2019a). Nesse mesmo período, apenas cinco pontos de amostragem apresentaram qualidade da água “boa”, ao passo que a grande maioria foi classificada como “ruim” ou “muito ruim” refletindo, assim, águas impróprias para tratamento convencional visando abastecimento público.

Ressalta-se também o fato de que no Brasil, assim como em outros países, o monitoramento da qualidade da água baseia-se fundamentalmente na presença e contabilização de coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Enterococcus* spp. (Diretiva Europeia 2006/7/EC). A presença destes grupos bacterianos indica a contaminação da água por esgoto ou quaisquer efluentes contendo matéria orgânica, sendo assim, indicadores de contaminação fecal recente (Resolução CONAMA nº 274/2000). A avaliação desses grupos bacterianos é de suma importância para a avaliação da balneabilidade e potabilidade das águas, contribuindo para a adoção de medidas públicas voltadas para a prevenção de doenças. Contudo, este monitoramento não fornece informações acerca do perfil de resistência aos antimicrobianos ou potencial patogênico de microrganismos presentes em ambientes aquáticos. Consequentemente, dados pertinentes no âmbito da saúde pública deixam de ser avaliados.

Apesar de ser um ambiente de notória importância, tanto ecológica quanto social, as medidas empregadas para a conservação da Baía de Guanabara têm se mostrado ineficientes. Em 1992, ano no qual o Rio de Janeiro foi a cidade sede da Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento (Eco-92), foram implementadas medidas como a criação do Programa de Despoluição da Baía de Guanabara (PDBG), que objetivaram a melhoria das condições de saneamento da região por meio da implantação de unidades de tratamento de esgoto (CEDAE, 2020b). Contudo, algumas unidades não foram construídas, além de outras não funcionarem em sua capacidade máxima (Fistarol *et al.*, 2015). Também, um dos grandes desafios para o tratamento do esgoto é a sua coleta nas cidades e o estabelecimento de uma conexão apropriada entre o sistema de coleta e as unidades de tratamento (Fries *et al.*, 2019). Em 2016, ano no qual a cidade do Rio de Janeiro sediou os Jogos Olímpicos de Verão, foram necessárias medidas para a melhoria da qualidade das águas da Baía de Guanabara, visto que estas seriam utilizadas para a realização de determinadas provas aquáticas. Na época, o governo do Estado planejava despoluir 80% daquelas águas, o que não foi cumprido e resultou numa avaliação geral negativa a respeito de sua qualidade (Alencar, 2016; National Geographic, 2016). Já em 2019, o Ministério Público do Estado do Rio de Janeiro (MPRJ), por meio do Grupo de Atuação Especializada em Meio Ambiente, assinou o Termo de Repactuação de Mediação com a CEDAE (Ref. Ação Civil Pública nº 0218928-66.2007.8.19.0001-13ª Vara de Fazenda Pública da Capital-RJ) objetivando a execução de medidas determinadas pelo PDBG (MPRJ, 2020).

Sendo assim, frente aos fatos supracitados e à tamanha relevância ambiental e social representada pela Baía de Guanabara, ressalta-se a importância de estudos voltados para a compreensão de sua comunidade microbiana, especialmente longitudinais. Investigações desta natureza contribuem para a elucidação dos mecanismos pelos quais estes microrganismos interagem com os outros seres vivos na região e como podem influenciar em questões de saúde pública.

2. JUSTIFICATIVA

O presente projeto engloba um dos ecossistemas mais importantes do Estado do Rio de Janeiro: a Baía de Guanabara. Este é um ambiente com notória relevância histórica, social e ecológica, sendo utilizado por muitos moradores como fonte de subsistência e/ou recreação (Fistarol *et al.*, 2015). Apesar de sua importância, a Baía de Guanabara sofre com o crescente impacto negativo da influência antropogênica em suas águas, seja pelo despejo de quantidades expressivas de esgoto não tratado, efluentes das mais variadas origens ou ainda pelo depósito de lixo. Nesse sentido, existe uma disparidade de conhecimento no que se refere aos reais riscos da exposição a suas águas à saúde humana e de animais, o que ressalta a imprescindibilidade de estudos voltados para a melhor compreensão deste ecossistema complexo.

À vista disso, foi investigado um gênero bacteriano reconhecidamente onipresente e de significativa importância em ambientes aquáticos: o gênero *Vibrio*. Estudos realizados previamente propuseram que contagens de 200 UFC de *Vibrio* por mililitro tendem a evidenciar águas do mar poluídas (Dinsdale *et al.*, 2008; Gregoracci *et al.*, 2012). Além disso, bactérias desse gênero possuem tempos de geração curtos e são de cultivo relativamente fácil (Ulitzur, 1974; Zhang *et al.*, 2018). Vale destacar também o potencial risco à saúde humana que determinadas espécies desse gênero oferecem. Um estudo realizado em 2012 relatou que *V. parahaemolyticus*, uma espécie patogênica a seres humanos, foi uma das mais frequentemente isoladas nas águas da Baía de Guanabara (Gregoracci *et al.*, 2012). Ademais, um estudo recente do nosso grupo de pesquisa demonstrou que bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*, incluindo estirpes multirresistentes, podem ser isoladas de esponjas das espécies *Darwinella* sp., *Haliclona* sp. e *Plakina cyanorosea* coletadas no litoral do Estado do Rio de Janeiro (Costa, 2018). Sob essa perspectiva, enfatiza-se que os procedimentos vigentes para a determinação da qualidade de ambientes aquáticos recreativos não fornecem informações acerca do potencial patogênico ou perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos da comunidade bacteriana. Assim, a detecção de *Vibrio* spp. apresenta-se como uma boa alternativa adicional para o monitoramento da qualidade de ambientes aquáticos.

Considerando os fatos supracitados, evidencia-se a Baía de Guanabara como um ambiente submetido à forte influência antropogênica e dotado de uma complexa comunidade microbiana. Atualmente, esses dados tornam-se ainda mais pertinentes sob a perspectiva do conceito de Saúde Única (*One Health*). Desse modo, o presente estudo buscou fornecer dados a respeito de um gênero bacteriano de relevância médica e ambiental inserido em um ecossistema de notável importância para os habitantes da cidade do Rio de Janeiro e região

metropolitana, contribuindo também para o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável 6 e 14 da Agenda de 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU), voltados para as temáticas de água potável e saneamento e vida na água, respectivamente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Descrever as espécies de *Vibrio* e suas características de resistência aos antimicrobianos em amostras de água obtidas da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

1. Isolar e identificar bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* a partir de amostras de água coletadas na Baía de Guanabara ao longo do período de um ano;
2. Rastrear a produção de substâncias antimicrobianas pelas estirpes de *Vibrio* contra bactérias de relevância médica;
3. Determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos das estirpes isoladas;
4. Avaliar a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e de carbapenemases por estirpes resistentes a beta-lactâmicos;
5. Avaliar a variação da frequência de espécies de *Vibrio* isoladas ao longo do período de um ano nos pontos de coleta estudados;
6. Avaliar a influência de fatores ambientais na comunidade cultivável de *Vibrio* spp. na Baía de Guanabara;
7. Investigar a diversidade e proximidade genética entre diferentes espécies de *Vibrio* resistentes aos antimicrobianos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta das amostras de água da Baía de Guanabara

O presente projeto está inserido em uma rede de estudos de longa duração sobre a observação da Baía de Guanabara, coordenada pelo Professor Rodolfo Pinheiro da Rocha Paranhos do Laboratório de Hidrobiologia no Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Tal monitoramento vem, desde o mês de abril de 1997, documentando mensalmente informações bióticas e abióticas daquelas águas, que podem ser consultadas em <http://www.hidrobiologia.intranet.biologia.ufrj.br/baia.html>.

O desenho experimental desenvolvido no projeto está representado na **figura 6**. Neste estudo foram analisadas 66 amostras de água oriundas de três locais na Baía de Guanabara representando três níveis tróficos distintos: ponto 1, na entrada da Baía, próximo à praia da Urca (Latitude: -22.928539''N, Longitude: -43.147539''W), ponto 7, situado nas proximidades da ponte Rio-Niterói (Latitude: -22.877931''N, Longitude: -43.166047''W) e ponto 34, localizado próximo às ilhas do Governador e do Fundão (Latitude: -22.835935''N, Longitude: -43.248184''W) (**figura 7A**).

O ponto 1 é fortemente influenciado pelas águas do Oceano Atlântico e pela maré. Em períodos de maré baixa, a água do interior da Baía tende a se deslocar para o Oceano, ao passo que períodos de maré alta favorecem a entrada de água oceânica. Já o ponto 7 é um local “intermediário”, recebendo águas do Oceano e do interior da Baía. Por fim, o ponto 34 é o mais próximo à costa e sofre grande influência da ação antropogênica, visto que se localiza nas proximidades das ilhas do Governador e do Fundão, canais como o da Penha, de Irajá e do Cunha e dos rios Sarapuí e Irajá, considerados muito impactados e, frequentemente, recebem o despejo de esgoto *in natura*. Ressalta-se também a existência de diversas estações de tratamento de esgoto ao redor da Baía de Guanabara, que contribuem para o despejo de matéria orgânica nestas águas, contribuindo, assim, para sua contaminação.

As coletas das amostras de águas foram realizadas em expedições mensais em cada ponto analisado na Baía de Guanabara, no período de junho de 2018 a maio de 2019, no turno da manhã (entre 08:00 e 10:00 horas) e em dias de maré vazante. Em cada ponto foram coletados 500 mL de água, tanto da superfície (1,0 m) quanto do fundo (6,0 – 20,0 m), já que diferenças entre salinidade, luminosidade e temperatura podem exercer influência na comunidade bacteriana. Até o processamento, as amostras de água foram armazenadas em frascos plásticos estéreis, em ambiente refrigerado (**figura 7B**).

Adicionalmente, o grupo do Laboratório de Hidrobiologia da UFRJ determinou, em cada expedição de coleta, os seguintes fatores ambientais: temperatura do ar e da água (°C), salinidade (S), fósforo total ($\mu\text{mol/L}$), nitrogênio total ($\mu\text{mol/L}$), clorofila ($\mu\text{g/L}$) e feofitina ($\mu\text{g/L}$). Contagens de coliformes termotolerantes e totais (NMP/100 mL), *Escherichia coli* (NMP/100 mL) e bactérias heterotróficas (UFC/mL) foram determinadas pelo laboratório BAKTRON.

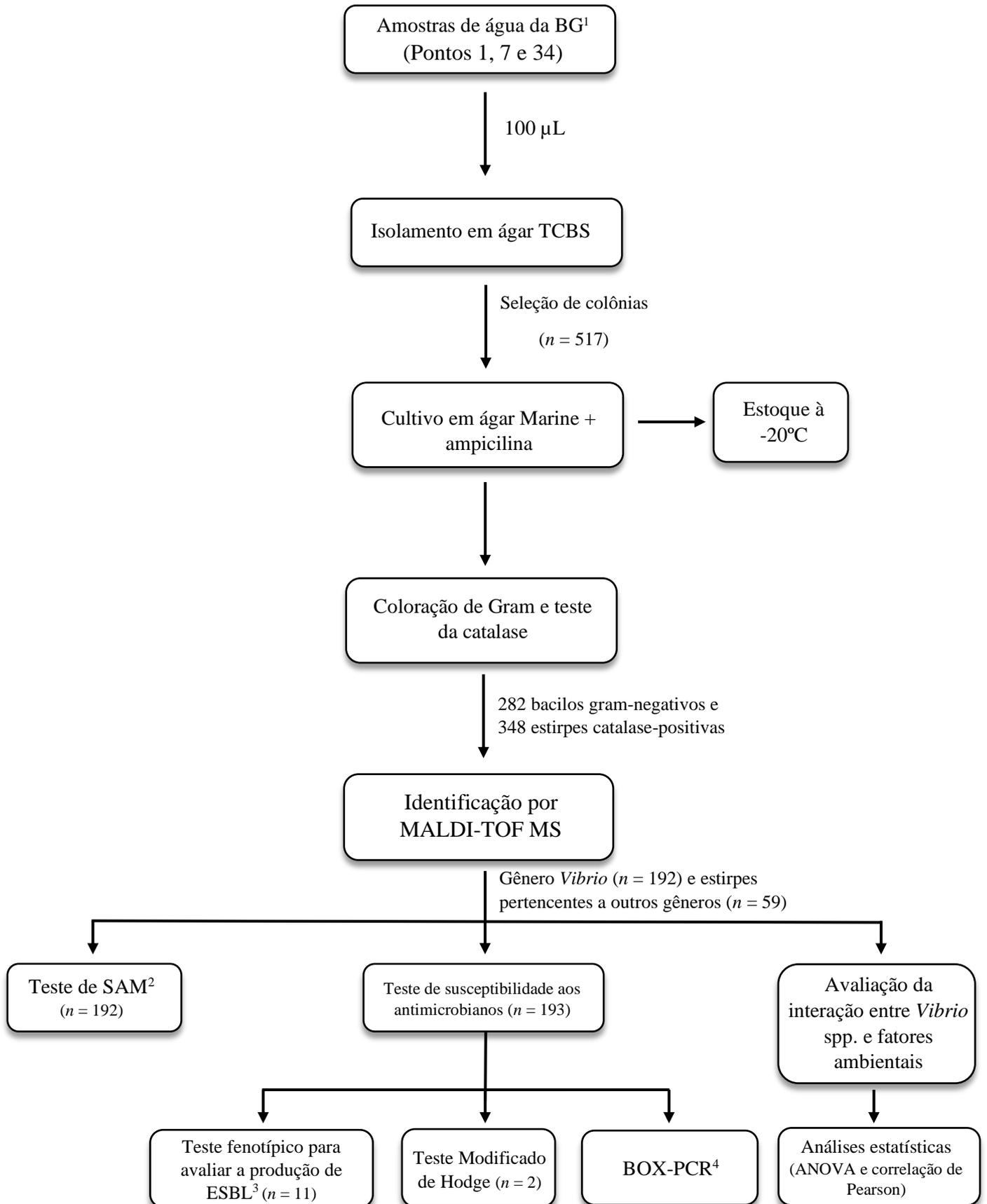


Figura 6 – Fluxograma das principais etapas do presente projeto. ¹ BG: Baía de Guanabara; ² SAM: substâncias antimicrobianas; ³ beta-lactamases de espectro estendido; ⁴ BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic-PCR.

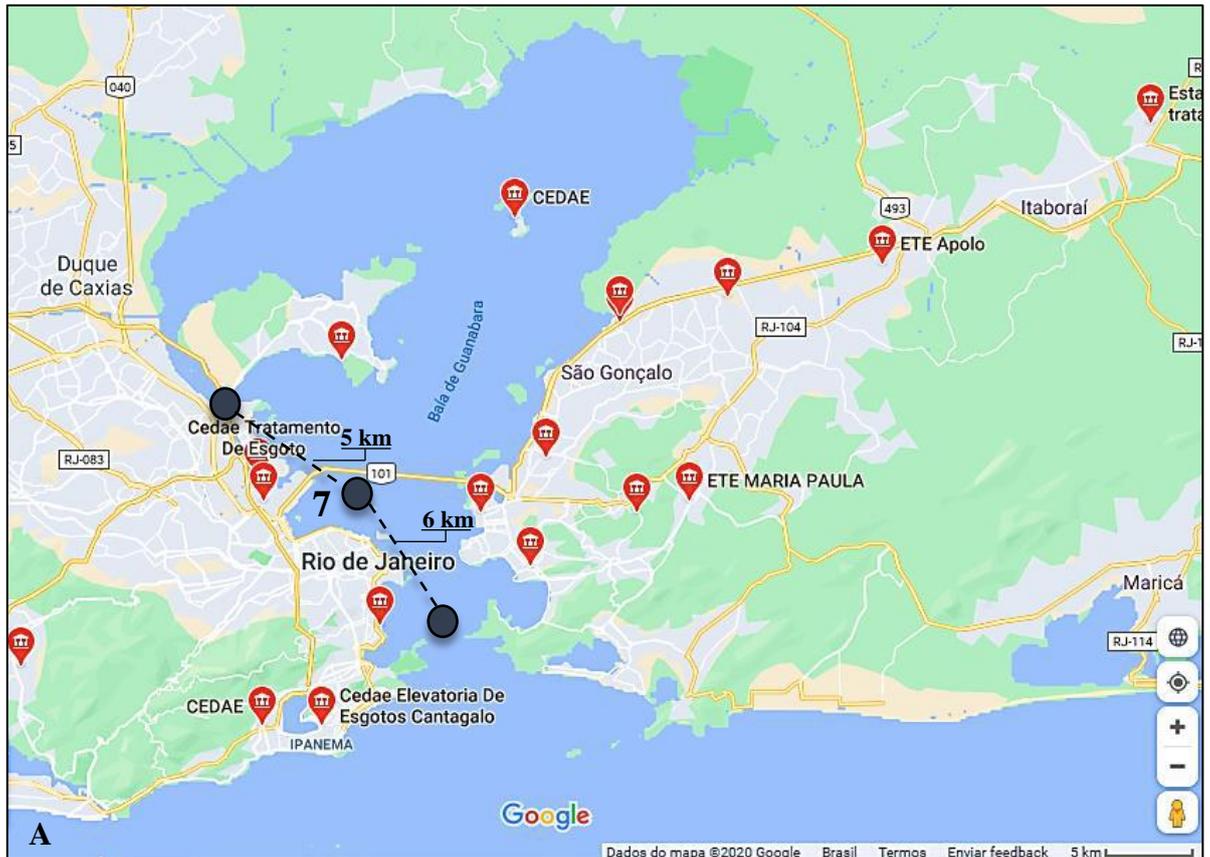


Figura 7 – Pontos de coleta na Baía de Guanabara. (A) Os três pontos de coleta (1, 7 e 34) estão indicados pelos marcadores cinzas e as distâncias entre eles estão indicadas em quilômetros. Marcadores vermelhos indicam as estações de tratamento de esgoto localizadas ao redor da Baía de Guanabara. (B) Frascos estéreis de 500 mL utilizados nas coletas de água. [Fontes: Google Maps e arquivo pessoal].

4.2. Isolamento bacteriano a partir de amostras de água da Baía de Guanabara

O isolamento de bactérias do gênero *Vibrio* foi realizado em ágar TCBS (Isifar, Rio de Janeiro, Brasil), seletivo para tal gênero. Para isso, 100 µL de água coletada de cada ponto foram inoculados em ágar TCBS e, com auxílio de alça de Drigalski, espalhados por toda a sua superfície de forma confluyente. Após a secagem, as placas foram incubadas à 25°C durante 24 horas. Posteriormente à detecção de crescimento bacteriano, as colônias foram contadas nas placas de forma a se determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) e, a partir disso, calculou-se o valor correspondente em UFC/mL.

A seguir, foram selecionadas cerca de 5 a 10 colônias com características morfológicas sugestivas de *Vibrio*, de acordo com o manual do fabricante, conforme previamente mencionado no item 1.1.5. Cada colônia selecionada foi nomeada de acordo com o ponto de coleta, profundidade e ordem de isolamento. A título de exemplo, a primeira bactéria isolada de uma amostra de água oriunda do ponto 1 superfície recebeu a identificação de “B1S-1” e assim por diante.

As UFCs selecionadas em ágar TCBS foram, então, semeadas em ágar Marine (Difco, EUA) acrescido de ampicilina (16 µg/mL), a fim de se aumentar as chances de recuperação de bactérias do gênero *Vibrio*. Assim, ao proporcionar um ambiente com pressão seletiva imposta pela ampicilina, objetivou-se que *Vibrio* spp. permanecessem viáveis, mas que outras bactérias, especialmente gram-positivas, não. A ampicilina foi escolhida em virtude da tendência deste gênero bacteriano em apresentar resistência a este antimicrobiano (Chiou *et al.*, 2015). Uma vez purificadas, as bactérias foram, então, preservadas em caldo Marine acrescido de 30% de glicerol (v/v) e estocadas a -20 °C.

4.3. Caracterização fenotípica das bactérias isoladas

As colônias purificadas que permaneceram viáveis foram caracterizadas quanto ao perfil fenotípico por meio da coloração de Gram e teste da catalase. A coloração de Gram tem como princípio a diferenciação de bactérias com base em suas paredes celulares. Bactérias gram-positivas possuem parede celular com uma camada espessa de peptidoglicano, que retém o corante cristal violeta, ao passo que gram-negativas apresentam uma camada mais delgada que, somada à presença de membrana externa fosfolipídica, permite a lavagem do cristal violeta

e retenção do corante fucsina. Dessa maneira, bactérias gram-positivas permanecem com coloração roxa, enquanto as gram-negativas assumem coloração rosa. Em se tratando de *Vibrio* spp., esperou-se a observação de bacilos curvos gram-negativos ao microscópio óptico (aumento de 1000 vezes).

Em relação ao teste da catalase, objetivou-se determinar se a bactéria era produtora da enzima catalase, responsável pela hidrólise de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Para isso, nos testes realizados em lâmina, as bactérias foram expostas ao peróxido de hidrogênio (3%) e a reação foi considerada positiva quando foi possível a observação da formação de bolhas, sendo este o resultado esperado para *Vibrio* spp. Como controle positivo e negativo do teste da catalase foi utilizada a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecium* ATCC 19434, respectivamente.

Os resultados da caracterização fenotípica aliados às observações referentes à morfologia colonial em ágar TCBS foram úteis para a triagem inicial de bactérias com características compatíveis com o gênero *Vibrio*.

4.4. MALDI-TOF MS

Objetivando-se confirmar a identificação presuntiva das bactérias isoladas, àquelas caracterizadas como bacilos gram-negativos e catalase-positivas foram submetidas à identificação pelo método de MALDI-TOF MS. Resumidamente, essa metodologia tem como princípio a comparação de espectros gerados com base no tempo de voo de partículas bacterianas conservadas com um banco de dados de espectros de estirpes de referência, a fim de se determinar sua identificação. Para isso, um laser incide na amostra, levando à dessorção de biomoléculas, como por exemplo, proteínas ribossomais e peptídeos. Essas moléculas são, então, ionizadas e aceleradas por um ambiente a vácuo, no qual se deslocam de acordo com a relação massa/carga (m/z) até atingirem um detector. Moléculas menores atingem tal detector mais rapidamente que moléculas maiores. Concomitantemente à chegada das moléculas no detector, é gerado um espectro de massas que é processado pelo *software* Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics, Alemanha) e comparado ao banco de dados contendo espectros de estirpes de referência, gerando *scores* (**Quadro 2**) que, por sua vez, são adotados para identificação das bactérias quanto ao gênero e/ou espécie (Maier *et al.*, 2006; Dekker e Branda, 2011; Singhal *et al.*, 2015).

Quadro 2 - Valores de referência dos *scores* de identificação utilizados na análise dos resultados obtidos por meio da metodologia de MALDI-TOF MS de acordo com o *software* Biotyper, versão 3.1 (Bruker Daltonics)

Valores dos <i>scores</i>	Descrição da identificação
2,300 ... 3,000	Altamente provável para espécie
2,000 ... 2,299	Segura para gênero, provável para espécie
1,700 ... 1,999	Provável para gênero
0,000 ... 1,699	Não confiável

Para a realização deste método, as estirpes selecionadas foram cultivadas em ágar Marine, seguido por incubação à 25 °C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, algumas colônias foram selecionadas e, com auxílio de uma haste de madeira estéril, depositadas em duplicata nos respectivos poços da placa de aço polida (96 MSP - Bruker Daltonics, EUA), conforme demonstrado na **figura 8 (A e B)**. A seguir, 1 µL de ácido fórmico foi aplicado na amostra. Após a secagem em temperatura ambiente, foi aplicado 1 µL de solução de matriz. Posteriormente à secagem em temperatura ambiente, a placa foi inserida no equipamento MALDI-TOF MicroflexLT (Bruker Daltonics, Alemanha). Como calibrante e controle para este método foi utilizada, em cada placa, a estirpe *E. coli* DH5α.

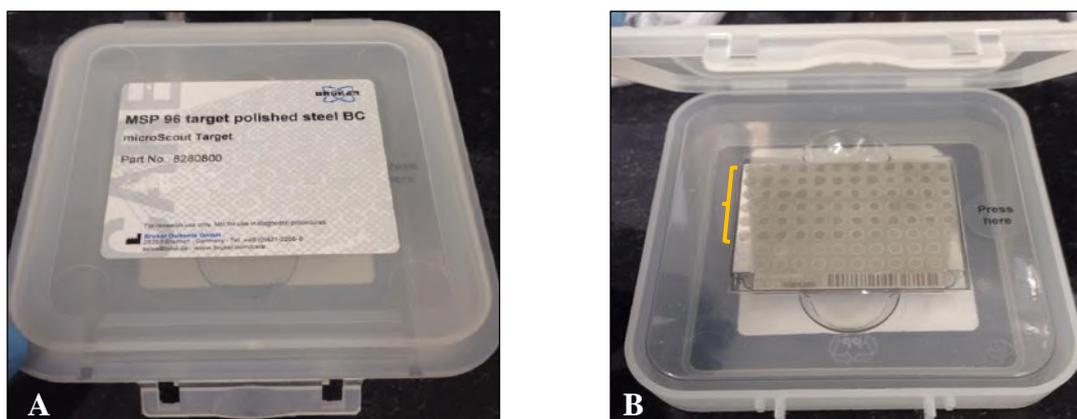


Figura 8 – (A) Placa de aço polida utilizada para a identificação por MALDI-TOF MS. (B) Bactérias depositadas, em duplicata, nos espaços demarcados da placa metálica (indicadas pela chave).

4.5. Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas

Visando investigar o potencial biotecnológico das bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* isoladas das águas da Baía de Guanabara, foi conduzido um ensaio, em duplicata, para verificar a produção de substâncias antimicrobianas (SAM), de acordo com o descrito por Marinho e colaboradores (2009).

Inicialmente, 10 μ L (aproximadamente 10^7 células) das culturas das estirpes identificadas como *Vibrio*, previamente cultivadas em caldo Marine à 25 °C por 24 horas, foram inoculadas na forma de *spots*, para que seu crescimento ocorresse de forma puntiforme em ágar Marine, seguido por incubação à 25 °C por 24 horas. Subsequentemente, as bactérias crescidas foram expostas a vapores de clorofórmio durante 40 minutos, com a finalidade de matar todas as células. Terminado esse tempo, as placas foram mantidas abertas em fluxo laminar durante 30 minutos, para que os resíduos de clorofórmio evaporassem. Em seguida, cerca de 10^5 células das estirpes indicadoras (*E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923) foram inoculadas em 3 mL de meio BHI (Difco, EUA) semissólido (0,7% de ágar) e vertidas sobre as estirpes de *Vibrio* avaliadas, de forma a cobrir toda a superfície do ágar. As placas foram incubadas à 37°C por 24 horas. Após esse tempo, o diâmetro das zonas de inibição em torno da estirpe marinha foi medido com auxílio de uma régua. Uma estirpe foi considerada produtora de substância antimicrobiana (SAM-positiva), quando apresentou halo de inibição com diâmetro maior ou igual à oito milímetros, dado que este é o diâmetro médio geralmente apresentado pelos *spots* das estirpes marinhas investigadas como potenciais produtoras.

4.6. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

4.6.1. Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos

As bactérias identificadas por MALDI-TOF MS foram submetidas ao antibiograma ou teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA), no qual foram testados os seguintes antimicrobianos, selecionados de acordo com o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010): amicacina (30 μ g), amoxicilina-ácido clavulânico (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), imipenem (10 μ g), sulfametoxazol-trimetoprim (25 μ g) e tetraciclina (25 μ g) (Sensidisc, Brasil) (**Quadro 3**). Esse ensaio foi conduzido seguindo a metodologia descrita por Kirby-Bauer, com modificações, e os resultados encontrados foram interpretados de acordo com as diretrizes do CLSI M-45 (2010), a partir das quais as bactérias foram classificadas como susceptíveis, intermediárias ou resistentes aos antimicrobianos testados.

Para a realização dos antibiogramas, as estirpes selecionadas foram cultivadas em ágar Marine, seguido por incubação à 25 °C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, algumas colônias foram selecionadas com auxílio de uma alça bacteriológica e transferidas para tubos contendo solução salina estéril (NaCl 0,85%, p/v), até que o grau de turbidez fosse compatível

ao padrão 0,5 na escala de MacFarland (cerca de $1,5 \times 10^8$ células/mL). Em seguida, com auxílio de um *swab* estéril, foi realizada a semeadura de forma confluenta em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Espanha). Após a secagem, foram depositados os discos impregnados com cada antimicrobiano com auxílio de uma pinça previamente flambada. Posteriormente, as culturas foram incubadas à 25°C por 18 a 24 horas e a leitura dos resultados foi realizada a partir da medição dos halos de inibição em milímetros, com auxílio de uma régua, imediatamente após esse período. A estirpe de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle.

Aquelas bactérias classificadas como não-susceptíveis (resistentes e/ou intermediárias) aos antimicrobianos testados tiveram seu índice de múltipla resistência (MAR) calculado através da razão a/b , onde a corresponde ao número de antimicrobianos aos quais foi considerada não susceptível e b , ao número de antimicrobianos aos quais foi exposta (Jiang *et al.*, 2014). De acordo com o conceito proposto, e amplamente aceito na literatura, por Magiorakos e colaboradores (2012), foram consideradas multirresistentes aquelas bactérias não susceptíveis a três ou mais classes de antimicrobianos.

Quadro 3 – Antimicrobianos utilizados para determinação da susceptibilidade de bactérias isoladas das águas da Baía de Guanabara, selecionados de acordo com o CLSI (2010), com suas respectivas siglas, classes, concentrações empregadas e mecanismos de ação

Antimicrobiano	Sigla	Classe	Concentração nos discos (µg)	Mecanismo de ação
Amicacina	AMI	Aminoglicosídeos	30	Inibição da síntese proteica
Tetraciclina	TET	Tetraciclina	30	
Amoxicilina-ácido clavulânico	AMC	Beta-lactâmicos	20	Inibição da síntese da parede celular
Cefotaxima (cefalosporina de 3ª geração)	CTX		30	
Ceftazidima (cefalosporina de 3ª geração)	CAZ		30	
Imipenem (carbapenema)	IPM		10	
Ciprofloxacina (fluoroquinolona)	CIP	Quinolonas	5	Inibição da síntese de DNA
Sulfametoxazol-trimetoprim	SUT	Sulfonamidas	23,75/1,25	Inibição do metabolismo do ácido fólico

4.6.2. Teste fenotípico para avaliação da produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

As bactérias consideradas resistentes a pelo menos dois antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos foram avaliadas quanto a capacidade de produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês, “*Extended-Spectrum Beta-Lactamases*”) da seguinte maneira: a partir de crescimento bacteriano recente em ágar Marine, foi preparado um inóculo à 0,5 MacFarland com a bactéria a ser testada e este foi semeado, com auxílio de *swab* estéril, em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Um disco de amoxicilina-ácido clavulânico (beta-lactâmico; 30 µg) foi disposto com auxílio de uma pinça previamente flambada no centro da placa e cercado por discos de ceftazidima (cefalosporina de terceira geração; 30 µg), cefepime (cefalosporina de quarta geração; 30 µg), ceftriaxona (cefalosporina de terceira geração; 30 µg) e aztreonam (monobactâmico; 30 µg) à 20 milímetros de distância uns dos outros. Pelo fato de as ESBL serem capazes de hidrolisar cefalosporinas e monobactâmicos, mas serem inibidas por ácido clavulânico, infere-se que a estirpe seja positiva quando for possível a observação do aumento do halo de inibição ao redor de qualquer um dos discos de beta-lactâmicos, conhecido como “halo fantasma”. Esse fenômeno ocorre devido à inibição da beta-lactamase pelo ácido clavulânico, permitindo a atuação dos antimicrobianos testados (Akpaka e Swanston, 2008). As estirpes *E. coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

4.6.3. Teste fenotípico para avaliação da produção de carbapenemases (teste de Hodge modificado)

Quanto à produção de carbapenemases, aquelas bactérias classificadas como resistentes ao imipenem, antimicrobiano da subclasse dos carbapenemas, foram submetidas ao teste de Hodge modificado. Para a realização do teste, foi preparado um inóculo da estirpe de *E. coli* ATCC 25922 correspondente ao grau de turbidez 0,5 na escala MacFarland. Com auxílio de *swab*, este inóculo foi semeado por toda a superfície do ágar Mueller-Hinton. Após a secagem, foi disposto um disco de ertapenem (carbapenema; 10 µg) no centro da placa de Petri. A estirpe-teste foi, então, estriada cautelosamente da região do centro para a periferia da placa, de modo que não entrasse

em contato com o disco propriamente dito. O princípio deste teste se baseia na capacidade de inibição do carbapenema por estirpes produtoras de carbapenemases (estirpes-teste). Ao fazê-lo, a estirpe de *E. coli* ATCC 25922, susceptível a carbapenemas, torna-se capaz de crescer em direção ao disco de ertapenem, causando distorção do halo de inibição. A estirpe de *K. pneumoniae* ATCC 700603 foi utilizada como controle negativo (ANVISA, 2008; Amjad *et al*, 2011).

4.7. Avaliação da variação da frequência de espécies de *Vibrio* em cada ponto de coleta ao longo do período de um ano na Baía de Guanabara

A partir dos resultados obtidos pela identificação por MALDI-TOF MS, as estirpes foram relacionadas aos pontos de coleta a partir dos quais foram isoladas. Com isso, objetivou-se determinar quais espécies são mais frequentes em determinados pontos na Baía de Guanabara. Para tal, gráficos foram elaborados utilizando os programas Excel 2016 e GraphPad Prism 8.0. A frequência de espécies em cada ponto de coleta também foi relacionada aos meses de coleta, a fim de se investigar a existência de um padrão sazonal espécie-específico.

4.8. Avaliação da influência de fatores ambientais na comunidade cultivável de *Vibrio* na Baía de Guanabara

A análise espaço-temporal da distribuição de *Vibrio* spp. em três pontos na Baía de Guanabara, tanto fundo quanto superfície (totalizando seis diferentes pontos), foi conduzida a fim de se investigar a existência de padrões entre a abundância de *Vibrio* spp. e os fatores ambientais previamente descritos no item 4.1. Para isso, a abundância de *Vibrio* (expressa em UFC/mL) foi inicialmente relacionada aos dados referentes aos fatores ambientais por meio da correlação de Pearson.

A fim de se determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre a abundância de *Vibrio* nos locais de coleta (fundo e superfície) e também entre os fatores ambientais em cada um destes locais, foi utilizada a ANOVA *One-Way*. A partir da obtenção de resultados estatisticamente significativos, o teste *post hoc* de Tukey foi realizado a fim de se determinar onde as diferenças ocorreram em cada caso analisado.

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa IBM SPSS Statistics versão 21.0, considerando um nível de significância de $p < 0,05$.

4.9. BOX-PCR

As estirpes identificadas como *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus* por MALDI-TOF MS e classificadas como não-susceptíveis (resistentes e/ou intermediárias) aos antimicrobianos foram selecionadas e submetidas a análise por PCR palindrômico extragênico repetitivo baseado em BOX-A1R (BOX-PCR). Tal experimento objetiva analisar o grau de proximidade e diversidade genética entre determinado grupo bacteriano, por meio da amplificação de uma região conservada de seus genomas (Struelens, 1998; Tacão *et al.*, 2005). Visto que o elemento BOX é sabidamente conservado em diversas espécies bacterianas, foi utilizado um primer específico para essa região, o BOX-A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GACG-3') (Versalovic *et al.*, 1994).

A obtenção do DNA total foi realizada utilizando a resina Chelex 100[®] (Bio-Rad Laboratories, EUA) submetida à lise térmica. Para isso, algumas colônias bacterianas foram selecionadas após crescimento recente em ágar Marine e, com auxílio de alça bacteriológica, dissolvidas em microtubos contendo 300 μ L da solução Chelex 5%. O conteúdo dos microtubos foi homogeneizado utilizando *vortex* por 15 segundos e incubado a 95 °C por 20 minutos. Em seguida, foi conduzida outra homogeneização por *vortex* durante 15 segundos. Feito isso, os microtubos foram submetidos à centrifugação em alta velocidade em microcentrífuga, durante 3 minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado a -20 °C para uso posterior como DNA molde para as reações de PCR.

As reações de amplificação para o BOX-PCR foram realizadas de acordo com o descrito por Freitas-Silva e colaboradores (2020) a partir do preparo de um *mix* de volume final de 25 μ L contendo: 1,0 μ L (50-100 ng) de DNA total, 9,1 μ L de água livre de nucleases, 12,5 μ L de tampão GoTaq[®] G2 Green Master Mix (2x; Promega, EUA), 0,2 μ L (0,4 mg/mL) de BSA, 1,2 μ L de Igepal 1% e 1,0 μ L (1 μ M) de primer BOX-A1R. Tais reações, cujas condições de ciclagem estão descritas na **Tabela 2**, foram realizadas em termociclador T100[™] *Thermal Cycler* (BIO-RAD[®], Hercules, EUA).

Os produtos da amplificação foram, então, analisados por eletroforese em gel de agarose (Promega, EUA) a 1,5% (p/v) em cuba horizontal, utilizando tampão TBE 0,5 X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) à 100 Volts durante três horas. Foram utilizados os marcadores de tamanho molecular de 1 kb e de 100 pb (Life Technologies, EUA). Posteriormente, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 30 minutos. A imagem foi, então, visualizada sob luz UV em transiluminador e salva em fotodocumentador *Doc-PrintII* (Sigma-Aldrich, EUA).

Os perfis de amplificação foram organizados em matrizes de acordo com a presença ou ausência de bandas (scores 1 e 0, respectivamente). A partir disso, foi possível a obtenção de um dendrograma utilizando os coeficientes de similaridade Dice e o método UPGMA (do inglês, *unweighted pair group method with arithmetic mean*) por meio do *software* Bionumerics versão 7.6 (Applied Maths, Bélgica).

Tabela 2 – Iniciador da reação, sua respectiva sequência nucleotídica e condições de ciclagem utilizadas para as reações de BOX-PCR

Iniciador	Sequência	Ciclo	Referência
BOX-A1R	5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GACG-3'	Desnaturação inicial por 1 min e 30 s a 94°C + 34 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 53°C, 1 min a 72°C, extensão final por 10 min a 72°C e resfriamento a 4°C.	Freitas-Silva <i>et al.</i> , 2020

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento bacteriano em ágar TCBS

O presente estudo buscou investigar a ocorrência de bactérias do gênero *Vibrio* em três pontos de coleta na Baía de Guanabara (1, 7 e 34) ao longo do período de um ano. Durante o período do estudo (junho de 2018 a maio de 2019), 66 amostras de água foram analisadas, a partir das quais 1.173 UFCs foram isoladas em ágar TCBS. Entre essas, 167 foram isoladas do ponto 1 (70 da superfície e 97 do fundo), 175 isoladas do ponto 7 (47 da superfície e 128 do fundo) e 831 do ponto 34 (648 da superfície e 183 do fundo). Assim, o ponto de coleta com a maior quantidade de bactérias isoladas foi o ponto 34 (70,80%), seguido pelo ponto 7 (15,00%) e ponto 1 (14,20%). O número de UFCs por mililitro foi calculado e o resultado obtido em cada ponto de coleta está representado na **figura 9**. Vale ressaltar ainda que as amostras de água coletadas na superfície resultaram no isolamento de uma quantidade maior de bactérias ($n = 765$; 65,20%) quando comparadas àquelas coletadas do fundo ($n = 408$; 34,80%). Exemplos de crescimento bacteriano em ágar TCBS após o isolamento estão representados na **figura 10**.

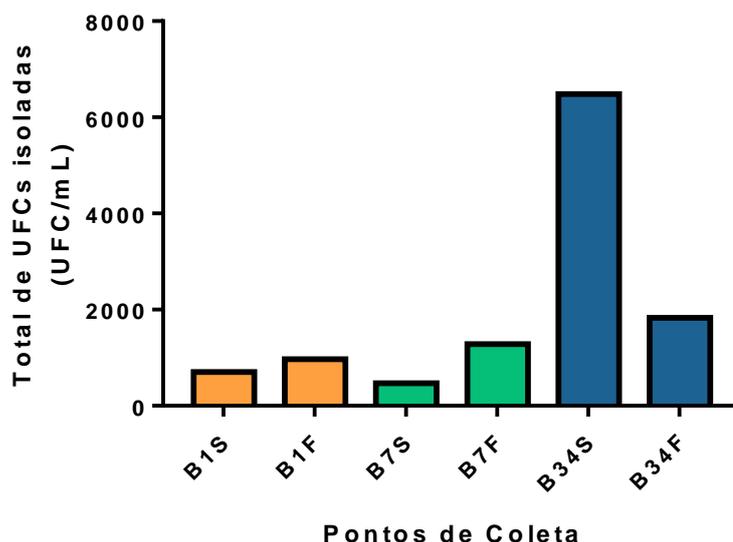


Figura 9 - Distribuição do total de UFCs/mL isoladas em cada ponto de coleta de água na Baía de Guanabara ao longo do período de um ano. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.

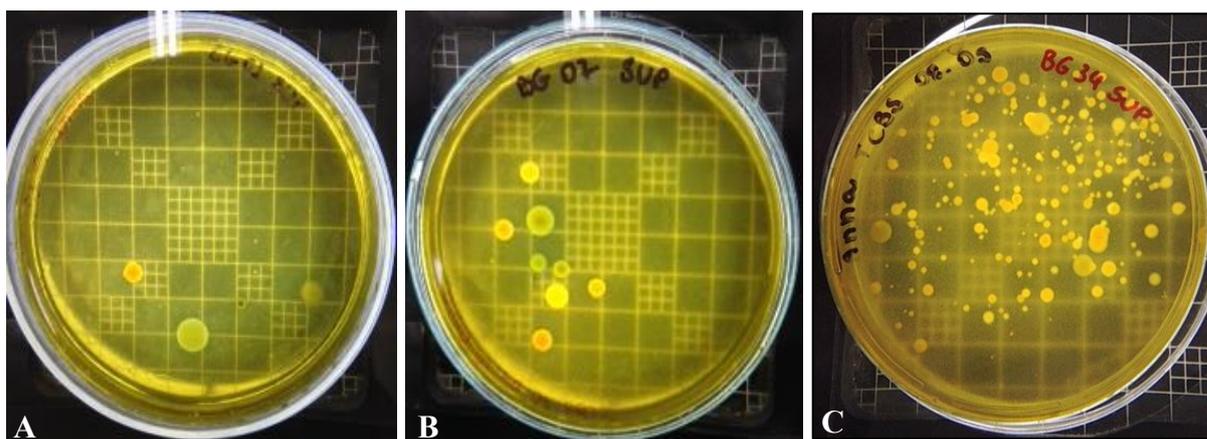


Figura 10 – Crescimento bacteriano obtido em cada ponto de coleta após semear 100 μ L de água em ágar TCBS, incubado durante 24 horas à 25 °C (A: ponto 1 superfície; B: ponto 7 superfície e C: ponto 34 superfície).

A quantidade de bactérias isoladas em cada expedição de coleta na Baía de Guanabara está representada na **figura 11**, a partir da qual concluiu-se que a coleta realizada em 21/06/2018 resultou em uma maior taxa de isolamento ($n = 3.560$ UFCs/mL), seguida pela coleta realizada em 27/05/2019 ($n = 1.950$ UFCs/mL) e 12/04/2019 ($n = 1.620$ UFCs/mL). A partir das UFCs isoladas, 517 colônias foram selecionadas para dar continuidade aos experimentos.

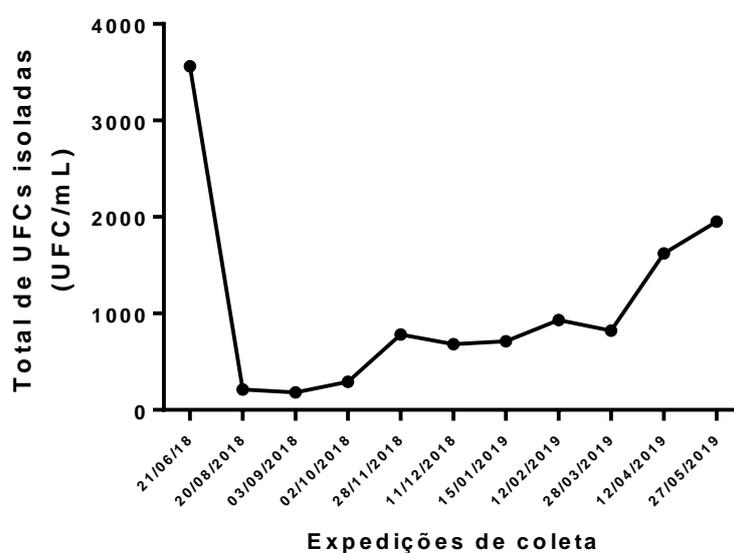


Figura 11 - Total de UFCs/mL isoladas em cada expedição de coleta de água na Baía de Guanabara no período entre 2018 e 2019.

5.2. Caracterização fenotípica

Entre as 517 bactérias selecionadas que permaneceram viáveis, 389 (75,20%) foram submetidas à caracterização fenotípica por coloração de Gram, a fim de se selecionar aquelas com características indicativas de *Vibrio*. Entre essas, 282 (72,50%) foram caracterizadas como bacilos gram-negativos. As que não foram assim classificadas, foram caracterizadas como cocos gram-negativos ($n = 29$), cocos gram-positivos ($n = 55$) ou bacilos Gram-positivos ($n = 23$). Já em relação ao teste da catalase, 414 bactérias (80,07%) foram avaliadas, das quais 348 (84,05%) foram classificadas como catalase-positivas e 66 (15,95%) como catalase-negativas. Ressalta-se também o fato de que 11,30% das estirpes ($n = 32$) classificadas como bacilos gram-negativos foram catalase-negativas, sugerindo a presença de outros gêneros bacterianos. Os resultados da caracterização fenotípica estão representados na **figura 12**.

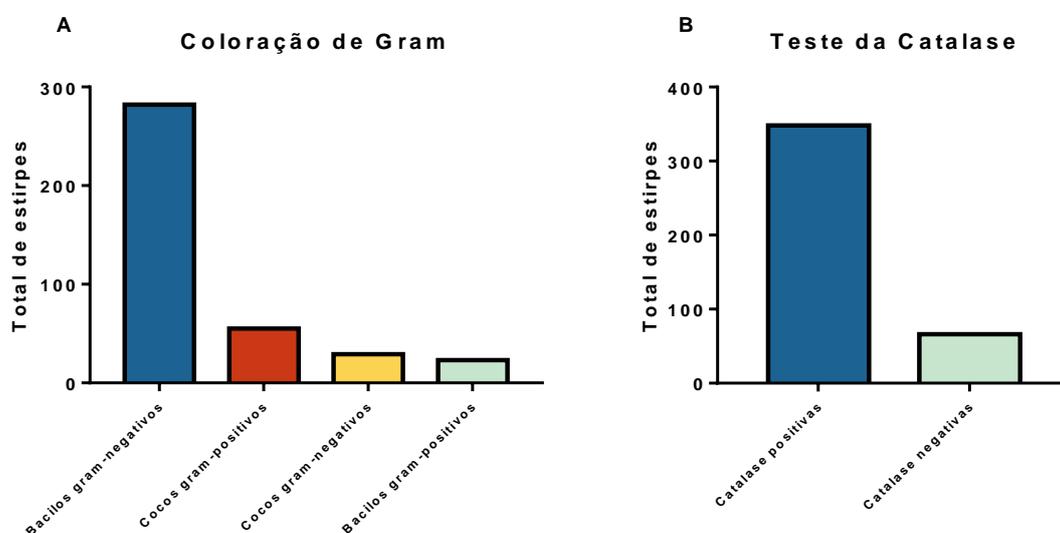


Figura 12 – Caracterização fenotípica das bactérias selecionadas e que permaneceram viáveis. Resultados obtidos na coloração de Gram (A) e teste da catalase (B).

5.3. Identificação por MALDI-TOF MS

5.3.1. Total de estirpes identificadas por MALDI-TOF MS

No total, 455 estirpes (88,00%) foram submetidas à identificação por MALDI-TOF MS, das quais 192 (42,20%) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*. Além disso, 59 estirpes (13,00%) foram identificadas por esta metodologia como pertencentes a outros gêneros bacterianos. Em contrapartida, 204 estirpes submetidas à identificação (44,80%) apresentaram *scores* entre 0,000 e 1,699, ou seja, não foram

adequadamente identificadas pela metodologia empregada. Entre estas, 137 foram estirpes classificadas como bacilos gram-negativos e catalase-positivos.

5.3.2. Identificação de *Vibrio* spp. por MALDI-TOF MS

Entre as 192 estirpes identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, 153 (79,70%) foram identificadas com *score* entre 1,700 e 1,999, indicando identificação provável para gênero, enquanto 39 estirpes (20,30%) foram identificadas com *score* entre 2,000 e 2,299, ou seja, com identificação segura para gênero e provável para espécie. O total de bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* foi relacionado aos pontos de coleta na Baía de Guanabara, bem como seus *scores* de identificação, e os resultados estão representados na **tabela 3**. A partir dessa análise, observou-se que o ponto 7 foi aquele que apresentou o maior número de bactérias identificadas como *Vibrio* spp. ($n = 72$; 37,50%), seguido pelo ponto 34 ($n = 62$; 32,30%) e ponto 1 ($n = 58$; 30,20%) (**figura 13**).

Tabela 3 – Relação entre os *scores* obtidos pela identificação por MALDI-TOF MS e os pontos de coleta na Baía de Guanabara

Ponto de coleta	Não identificado (<i>score</i> entre 0,000 e 1,699)	<i>Vibrio</i> com <i>score</i> entre 1,700 e 1,999	<i>Vibrio</i> com <i>score</i> entre 2,000 e 2,299	<i>Vibrio</i> com <i>score</i> entre 2,300 e 3,000
B1S ¹	33	21	5	0
B1F ²	39	29	3	0
B7S ³	20	16	5	0
B7F ⁴	41	43	8	0
B34S ⁵	21	19	15	0
B34F ⁶	50	25	3	0
Total	204	153	39	0

¹B1S: ponto 1 superfície; ²B1F: ponto 1 fundo; ³B7S: ponto 7 superfície; ⁴B7F: ponto 7 fundo; ⁵B34S: ponto 34 superfície; ⁶B34F: ponto 34 fundo.

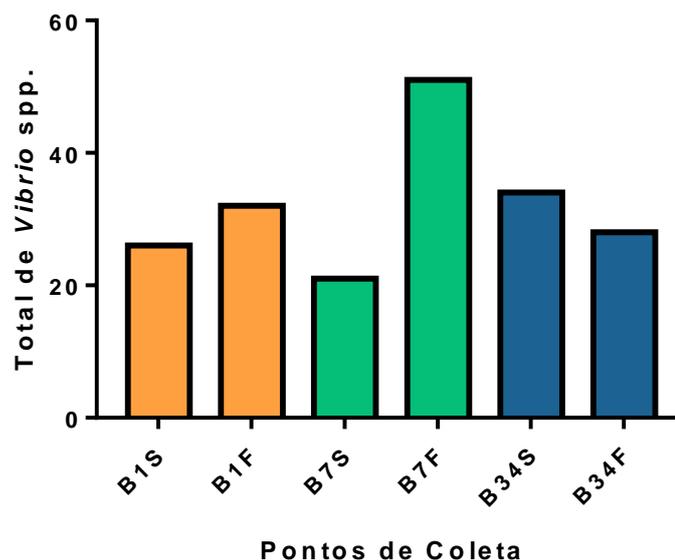


Figura 13 – Total de bactérias identificadas como *Vibrio* spp. pela metodologia de MALDI-TOF MS em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara, tanto em amostras de águas coletadas da superfície quanto do fundo. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.

Quando se comparou o total de *Vibrio* spp. identificado em amostras oriundas da superfície e do fundo, verificou-se que amostras do fundo foram as que apresentaram maiores taxas de bactérias pertencentes à este gênero ($n = 111$; 57,80%) em relação às amostras de água provenientes da superfície ($n = 81$; 42,20%).

Ademais, vinte espécies distintas foram detectadas, sendo *V. harveyi* a mais frequente ($n = 85$; 44,30%), seguida por *V. parahaemolyticus* ($n = 31$; 16,20%) e *V. mediterranei* ($n = 22$; 11,45%). A frequência de espécies identificadas em cada ponto de coleta está representada na **figura 14**, na qual observa-se que *V. harveyi* foi a espécie mais frequentemente isolada em todos os pontos analisados, tanto de amostras de água oriundas na superfície quanto no fundo. Observou-se também que o ponto 7 foi o que apresentou maior riqueza, com treze espécies distintas identificadas. A partir desses resultados verificou-se a presença de pelo menos uma espécie patogênica em todos os pontos estudados, como *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*.

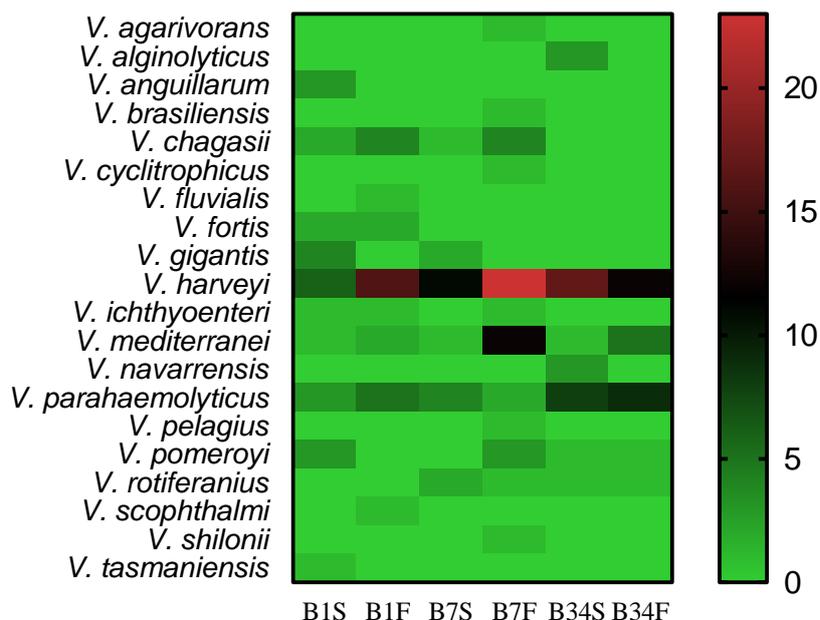


Figura 14 – Heatmap da distribuição de *Vibrio* spp. nos pontos de coleta na Baía de Guanabara, tanto em amostras oriundas da superfície quanto do fundo. O gradiente de cor indica a escala linear de *Vibrio* spp. identificados por MALDI-TOF MS como a medida da abundância absoluta bacteriana em cada ponto de coleta. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.

5.3.3. Comparação das características morfo-coloniais em ágar TCBS e identificação por MALDI-TOF MS

De acordo com as instruções do fabricante do meio de cultura TCBS, determinadas espécies de *Vibrio* apresentam colônias com colorações específicas, de acordo com sua capacidade de fermentação da sacarose, como foi previamente descrito no item 1.1.5. Ao comparar as características morfo-coloniais bacterianas em ágar TCBS com a identificação obtida por MALDI-TOF MS, verificou-se que todas as bactérias identificadas como *V. alginolyticus* apresentaram colônias amarelas, concordando com o preconizado pelo fabricante. Contudo, todas estas estirpes obtiveram *scores* de identificação inferiores à 2,000, indicando identificação provável para gênero. Entre 29 bactérias identificadas como *V. parahaemolyticus*, 18 (62,00%) apresentaram colônias com coloração verde, duas (7,00%) coloração amarela esverdeada (possivelmente indicando a fermentação tardia da sacarose) e nove (31,00%) apresentaram coloração amarela. Entre as estirpes de *V. parahaemolyticus*, seis obtiveram *score* de identificação superior à 2,000, sendo duas com coloração verde e quatro com coloração amarela.

5.3.4. Identificação de outros gêneros bacterianos por MALDI-TOF MS

Em relação às estirpes classificadas como não pertencentes ao gênero *Vibrio* pela metodologia de MALDI-TOF MS, 59 (13,00%) foram assim identificadas. Sob essa perspectiva, *Photobacterium* ($n = 27$) foi o gênero mais isolado, seguido por *Aeromonas* ($n = 17$) (**figura 15**). Bactérias do gênero *Photobacterium* foram isoladas em todos os pontos de coleta, tanto da superfície quanto do fundo. Além disso, o ponto 34 foi aquele a partir do qual o maior número de estirpes identificadas como não pertencentes ao gênero *Vibrio* foi isolado em ágar TCBS, isto é, de 172 bactérias submetidas à identificação, 39 (22,70%) não pertenciam ao gênero *Vibrio*.

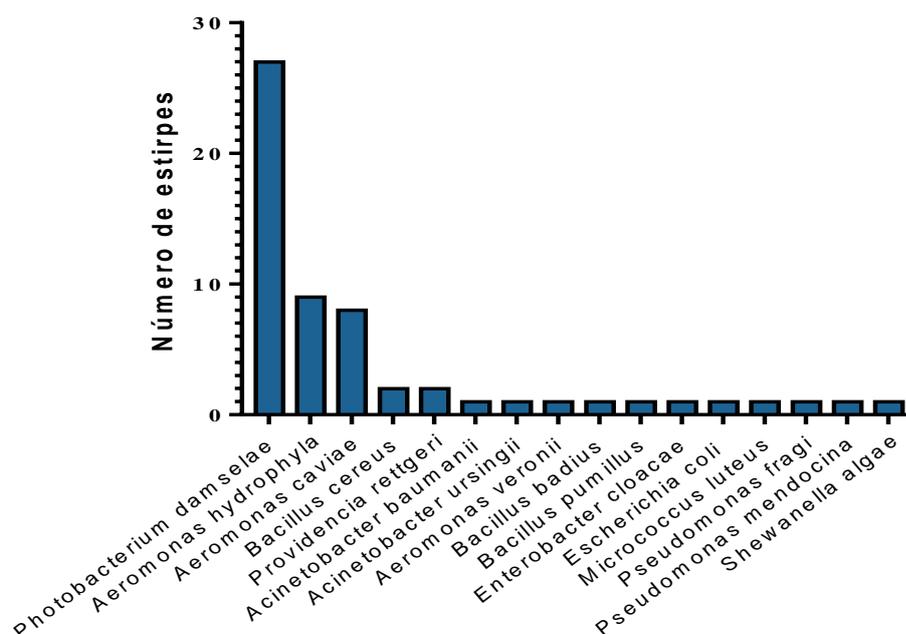


Figura 15 – Microrganismos isolados em ágar TCBS e identificados por MALDI-TOF MS como não pertencentes ao gênero *Vibrio*.

5.3.5. Distribuição das estirpes identificadas em cada ponto de coleta

O total de espécies identificadas por MALDI-TOF MS foi relacionado aos pontos de coleta na Baía de Guanabara, tanto na superfície quanto no fundo, e os resultados estão representados na **figura 16**.

A análise de variância a um fator (ANOVA) foi conduzida a fim de se determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os pontos de coleta e a abundância de *Vibrio* (UFC/mL) em cada um destes pontos. No entanto, os resultados

5.3.6. Total de espécies identificadas ao longo do período de um ano

Ao analisar-se o total de estirpes identificadas pela metodologia de MALDI-TOF MS em cada expedição de coleta, observou-se que a coleta realizada em abril de 2019 foi a que apresentou a maior taxa de identificação ($n = 42$), seguida pela coleta realizada em março deste mesmo ano ($n = 40$). Em contrapartida, as coletas com as menores taxas de identificação foram as realizadas em agosto e setembro de 2018, nas quais apenas 8 estirpes foram identificadas.

Em relação ao gênero *Vibrio*, a expedição de coleta com o maior número de estirpes identificadas como pertencentes a este gênero foi a realizada em março de 2019 ($n = 30$), seguida pela coleta realizada em fevereiro ($n = 29$). A expedição de coleta com a menor taxa de identificação de *Vibrio* spp. foi a realizada em setembro de 2018, na qual apenas quatro estirpes foram identificadas como pertencentes a este gênero. A expedição de coleta que resultou em uma maior riqueza de espécies foi a realizada no mês de junho de 2018 ($n = 9$ espécies distintas), enquanto a expedição com o menor número de espécies distintas identificadas foi a realizada em setembro de 2018 ($n = 3$). No entanto, não foi detectada diferença significativa entre a abundância de *Vibrio* spp. entre as coletas ($p = 0,071$).

Observou-se que *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus* foram espécies isoladas em todas as expedições de coleta e em todos os pontos, tanto na superfície quanto no fundo, indicando sua presença na Baía de Guanabara ao longo do ano. Por outro lado, determinadas espécies foram detectadas apenas no ponto 7 (fundo) e em expedições de coletas pontuais, como por exemplo, *V. agarivorans* (detectada somente na coleta do dia 21/06/2018), *V. brasiliensis* (detectada somente na coleta do dia 12/04/2018), *V. cyclitrophicus* (detectada somente na coleta do dia 28/03/2019), *V. pelagius* (detectada somente na coleta do dia 12/02/2019) e *V. shiloni* (detectada somente na coleta do dia 20/08/2018) (**figura 17**).

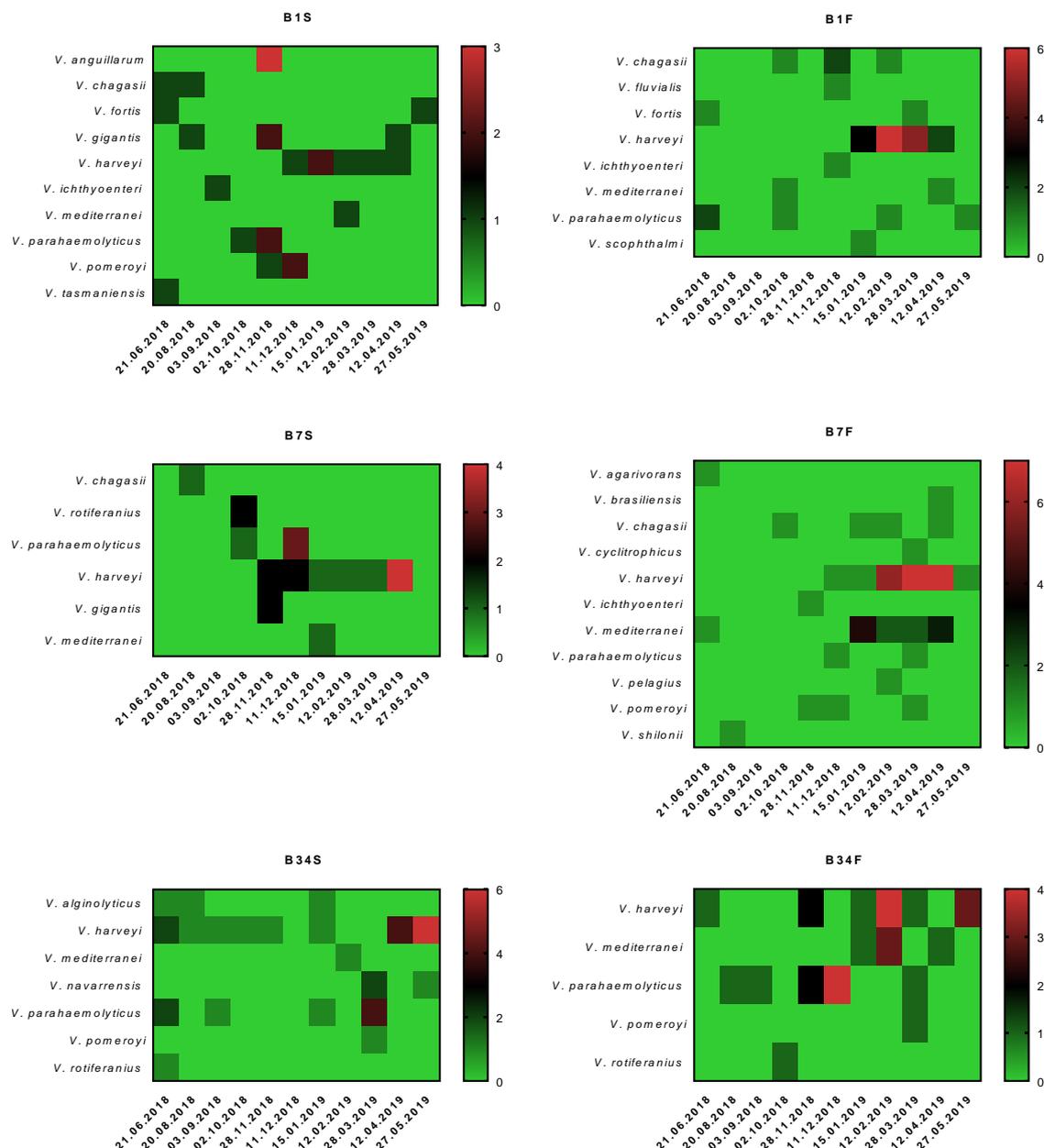


Figura 17 – Espécies de *Vibrio* identificadas por MALDI-TOF MS em cada expedição e em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara.

Em contrapartida, as expedições de coleta com o maior número de estirpes identificadas como pertencentes a outros gêneros foram àquelas realizadas em novembro de 2018 e março de 2019, ambas com seis outros gêneros identificados, seguidas pelo mês de abril de 2019, com cinco outros gêneros identificados (**figura 18**).

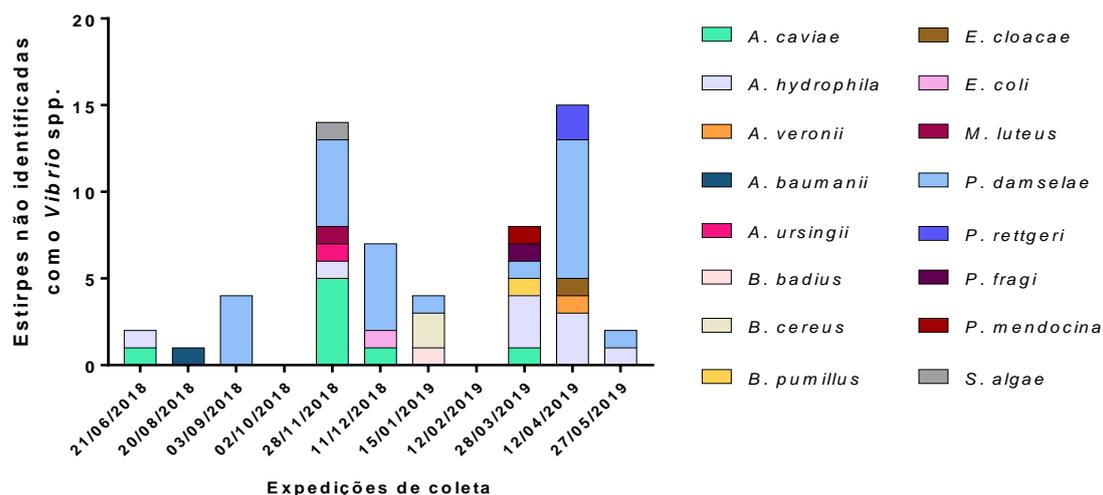


Figura 18 – Distribuição de gêneros bacterianos não identificados como pertencentes ao gênero *Vibrio* ao longo do período de um ano na Baía de Guanabara.

5.4. Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas (SAM)

Com o objetivo de avaliar o potencial de produção de substâncias com atividade inibitória contra estirpes de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923, as 192 estirpes de *Vibrio* foram testadas. Contudo, nenhuma bactéria foi considerada positiva por meio da metodologia empregada (**figura 19**).

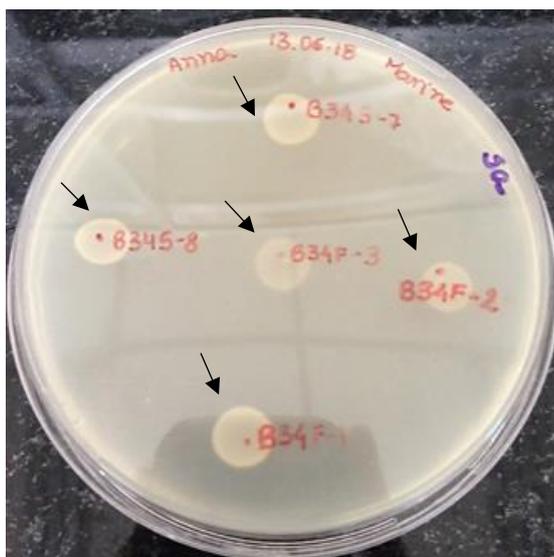


Figura 19 – Resultados do teste de SAM. A ausência de halos ao redor das estirpes testadas (crescimento puntiforme, indicado pelas setas) indica que são classificadas como negativas pela metodologia avaliada.

5.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

5.5.1. Total de estirpes avaliadas

Visando determinar o perfil de susceptibilidade de bactérias isoladas das águas da Baía de Guanabara, 193 estirpes que permaneceram viáveis foram submetidas ao teste de disco-difusão frente a oito antimicrobianos. Destas, 149 pertenciam ao gênero *Vibrio*. As outras 43 bactérias identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio* perderam sua viabilidade ao longo do tempo do estudo e, portanto, não puderam ser avaliadas. Outros bacilos gram-negativos também foram testados, sendo eles: *Photobacterium damsela* ($n = 20$), *Aeromonas hydrophila* ($n = 8$), *Aeromonas caviae* ($n = 4$), *Providencia rettgeri* ($n = 2$), *Aeromonas veronii* ($n = 1$), *Enterobacter cloacae* ($n = 1$), *Pseudomonas fragi* ($n = 1$) e *Pseudomonas mendocina* ($n = 1$), bem como seis estirpes não identificadas por MALDI-TOF MS, cujas características fenotípicas estão sumarizadas na **tabela 4**.

Tabela 4 – Características fenotípicas de seis estirpes não identificadas por MALDI-TOF MS submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Estirpes	Caracterização fenotípica		
	Coloração de Gram	Teste da Catalase	Cor da colônia
B7F-72	Bacilos gram-negativos	+	Verde
B34S-24	Bacilos gram-negativos	+	Verde
B34S-75	Bacilos gram-negativos	+	Amarela
B34S-78	Bacilos gram-negativos	+	Amarela
B34S-80	Bacilos gram-negativos	+	Amarela
B34S-81	Bacilos gram-negativos	+	Amarela

Resistência a todos os oito antimicrobianos testados foi detectada. Entre todas as estirpes avaliadas, 46,70% ($n = 90$) foram classificadas como não susceptíveis a ao menos um antimicrobiano, enquanto 103 estirpes (53,30%) foram classificadas como susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. No geral, os antimicrobianos com as maiores taxas de não-susceptibilidade foram: cefotaxima (24,30%), amicacina (22,80%) e amoxicilina-ácido clavulânico (17,00%). Em contrapartida, os antimicrobianos com as menores taxas de não-susceptibilidade foram imipenem (1,00%), tetraciclina (3,60%) e sulfametoxazol-trimetoprim (4,14%). Todos esses resultados estão apresentados na **tabela 5**.

Tabela 5 – Susceptibilidade das 193 estirpes avaliadas no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Antimicrobiano ^a	Número de estirpes (%)		
	S ¹	I ²	R ³
AMI	149 (77,2%)	16 (8,3%)	28 (14,5%)
CTX	146 (75,6%)	16 (8,3%)	31 (16,1%)
IPM	191 (99,0%)	0	2 (1,0%)
AMC	160 (83,0%)	12 (6,2%)	21(10,8%)
CIP	175 (90,7%)	14 (7,3%)	4 (2,0%)
CAZ	176 (91,2%)	5 (2,6%)	12 (6,2%)
TET	186 (96,4%)	2 (1,0%)	5 (2,6%)
SUT	185 (95,9%)	0	8 (4,1%)

^a AMI: amicacina; CTX: cefotaxima; IPM: imipenem; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; CIP: ciprofloxacina; CAZ: ceftazidima; TET: tetraciclina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim. ¹S – susceptível ; ²I – intermediária; ³R – resistente

Em relação aos pontos de coleta, observou-se que o ponto 34 superfície foi aquele que apresentou a maior quantidade de bactérias não-susceptíveis ($n = 42$), seguido pelo ponto 7 ($n = 25$) e ponto 1 ($n = 23$). A distribuição da não-susceptibilidade aos antimicrobianos avaliados entre os pontos de coleta de todas as estirpes está representada na **tabela 6**. Ademais, o ponto 34 foi o único no qual foi detectada resistência a pelo menos um antimicrobiano em todas as classes avaliadas.

Tabela 6 – Distribuição das estirpes classificadas como não susceptíveis (resistentes e intermediárias) em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara, tanto da superfície quanto do fundo, e as respectivas porcentagens de acordo com o total de estirpes avaliadas em cada ponto de coleta

Ponto de coleta	Total de estirpes não-susceptíveis (%)							
	AMI ^a	CTX ^b	IPM ^c	AMC ^d	CIP ^e	CAZ ^f	TET ^g	SUT ^h
B1S¹	8 (32,0%)	6 (24,0%)	0	8 (32,0%)	1 (4,0%)	2 (8,0%)	0	0
B1F²	3 (15,0%)	6 (30,0%)	0	0	1 (5,0%)	2 (10,0%)	0	0
B7S³	3 (15,0%)	2 (10,0%)	0	0	2 (10,0%)	1 (5,0%)	0	0
B7F⁴	20 (35,7%)	13 (23,2%)	0	2 (3,5%)	7 (12,5%)	5 (8,9%)	0	1 (1,8%)
B34S⁵	6 (11,5%)	12 (23,0%)	1 (1,9%)	21 (40,3%)	5 (9,6%)	6 (11,5%)	6 (11,5%)	7 (13,4%)
B34F⁶	4 (20,0%)	8 (40,0%)	1 (5,0%)	2 (10,0%)	2 (10,0%)	1 (5,0%)	1 (5,0%)	0

^aAMI: amicacina; ^bCTX: cefotaxima; ^cIPM: imipenem; ^dAMC: amoxicilina-ácido clavulânico; ^eCIP: ciprofloxacina; ^fCAZ: ceftazidima; ^gTET: tetraciclina; ^hSUT: sulfametoxazol-trimetoprim. ¹B1S: ponto 1 superfície; ²B1F: ponto 1 fundo; ³B7S: ponto 7 superfície; ⁴B7F: ponto 7 fundo; ⁵B34S: ponto 34 superfície; ⁶B34F: ponto 34 fundo

5.5.2. Susceptibilidade de estirpes pertencentes ao gênero *Vibrio*

No que se refere exclusivamente ao gênero *Vibrio*, 64 estirpes foram consideradas não-susceptíveis a ao menos um antimicrobiano (43,00%) e a maior taxa de não-susceptibilidade foi à cefotaxima (25,50%), seguido por amicacina (22,10%) e ceftazidima (10,00%), conforme detalhado na **tabela 7**.

Tabela 7 – Susceptibilidade de 149 estirpes identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*

Antimicrobiano ^a	Número de estirpes (%)		
	S ¹	I ²	R ³
AMI	116 (78,0%)	12 (8,0%)	21 (14,0%)
CTX	111 (74,5%)	11 (7,4%)	27 (18,1%)
IPM	147 (98,6%)	0	2 (1,4%)
AMC	133 (89,3%)	7 (4,7%)	9 (6,0%)
CIP	135 (90,6%)	11 (7,4%)	3 (2,0%)
CAZ	134 (89,9%)	4 (2,7%)	11 (7,4%)
TET	147 (98,6%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)
SUT	146 (98,0%)	0	3 (2,0%)

^aAMI: amicacina; CTX: cefotaxima; IPM: imipenem; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; CIP: ciprofloxacina; CAZ: ceftazidima; TET: tetraciclina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim. ¹S – susceptível ; ²I – intermediária; ³R – resistente

Em relação aos pontos de coleta, observou-se que o ponto 7 fundo foi aquele que apresentou a maior quantidade de víbrios não-susceptíveis ($n = 16$), seguido pelo ponto 34 superfície ($n = 14$) e ponto 1 superfície ($n = 15$). A distribuição da não-susceptibilidade aos antimicrobianos avaliados entre os pontos de coleta está representada na **tabela 8**.

Tabela 8 – Distribuição das estirpes identificadas como *Vibrio* e classificadas como não susceptíveis (resistentes e intermediárias) em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara, tanto da superfície quanto do fundo, e as respectivas porcentagens de acordo com o total de estirpes avaliadas em cada local

Ponto de coleta	Estirpes de <i>Vibrio</i> spp. não susceptíveis (%)							
	AMI ^a	CTX ^b	IPM ^c	AMC ^d	CIP ^e	CAZ ^f	TET ^g	SUT ^h
B1S¹	7 (31,8%)	6 (27,3%)	0	7 (31,8%)	1 (4,5%)	2 (9,0%)	0	0
B1F²	3 (15,7%)	6 (31,5%)	0	0	1 (5,2%)	2 (10,5%)	0	0
B7S³	3 (15,7%)	2 (10,5%)	0	0	2 (10,5%)	1 (5,2%)	0	0
B7F⁴	15 (33,3%)	11 (24,4%)	0	1 (2,2%)	6 (13,3%)	5 (11,1%)	0	1 (2,2%)
B34S⁵	3 (10,3%)	7 (24,1%)	1 (3,4%)	6 (20,6%)	2 (6,8%)	4 (13,8%)	1 (3,4%)	2 (6,8%)
B34F⁶	3 (20,0%)	7 (46,6%)	1 (6,6%)	2 (13,3%)	2 (13,3%)	1 (6,6%)	1 (6,6%)	0

^aAMI: amicacina; ^bCTX: cefotaxima; ^cIPM: imipenem; ^dAMC: amoxicilina-ácido clavulânico; ^eCIP: ciprofloxacina; ^fCAZ: ceftazidima; ^gTET: tetraciclina; ^hSUT: sulfametoxazol-trimetoprim. ¹B1S: ponto 1 superfície; ²B1F: ponto 1 fundo; ³B7S: ponto 7 superfície; ⁴B7F: ponto 7 fundo; ⁵B34S: ponto 34 superfície; ⁶B34F: ponto 34 fundo

Por conta de sua relevância médica e também pelo fato de terem sido as mais frequentemente isoladas, as espécies *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* foram analisadas separadamente quanto à susceptibilidade (**figura 20**). Observou-se que 38,00% das estirpes de *V. parahaemolyticus* foram classificadas como resistentes à cefotaxima, enquanto 19,70% das estirpes de *V. harveyi* apresentaram resistência a este antimicrobiano. Apenas uma estirpe de *V. parahaemolyticus* apresentou resistência ao imipenem. Em geral, ambas as espécies apresentaram altas taxas de susceptibilidade à tetraciclina (95,20% das estirpes de *V. parahaemolyticus* e 98,60% das estirpes de *V. harveyi*) e à sulfametoxazol-trimetoprim (100,00% das estirpes de *V. parahaemolyticus* e 95,70% das estirpes de *V. harveyi*).

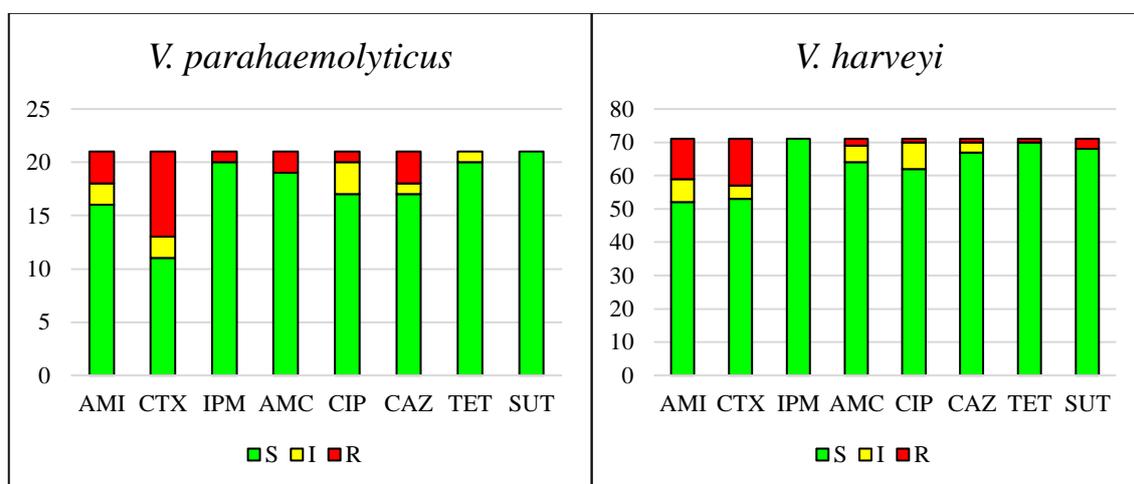


Figura 20 – Susceptibilidade das estirpes de *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi*. AMI: amicacina; CTX: cefotaxima; IPM: imipenem AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; CIP: ciprofloxacina; CAZ: ceftazidima; TET: tetraciclina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim. S – susceptível; I – intermediária; R – resistente.

5.5.3. Susceptibilidade de outros gêneros bacterianos avaliados

A susceptibilidade das estirpes não identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio* está apresentado na **tabela 9**, a partir da qual verifica-se que amoxicilina-ácido clavulânico foi o antimicrobiano com a maior taxa de não-susceptibilidade. Entre as estirpes não identificadas como *Vibrio*, 26 (59,00%) foram consideradas não susceptíveis à ao menos um antimicrobiano e nenhuma foi considerada resistente à imipenem.

Tabela 9 – Susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes identificadas como não pertencentes ao gênero *Vibrio*

Antimicrobiano ¹	<i>Aeromonas</i>			<i>Enterobacter</i>			<i>Photobacterium</i>			<i>Providencia</i>			<i>Pseudomonas</i>			Estirpes não identificadas			Total		
	S ^a	I ^b	R ^c	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMI	13	0	0	1	0	0	12	2	6	2	0	0	2	0	0	4	1	1	34 (77,2%)	3 (6,8%)	7 (16,0%)
CTX	12	1	0	0	0	1	17	2	1	2	0	0	1	0	1	1	1	4	33 (75,0%)	4 (9,0%)	7 (16,0%)
IPM	13	0	0	1	0	0	20	0	0	2	0	0	2	0	0	6	0	0	44 (100%)	0	0
AMC	5	3	5	1	0	0	19	0	1	0	0	2	1	0	1	2	2	2	28 (63,6%)	5 (11,4%)	11 (25,0%)
CIP	13	0	0	1	0	0	20	0	0	2	0	0	1	1	0	3	2	1	40 (90,9%)	3 (6,8%)	1 (2,3%)
CAZ	13	0	0	0	0	1	20	0	0	2	0	0	2	0	0	5	1	0	42 (95,4%)	1 (2,3%)	1 (2,3%)
TET	12	1	0	1	0	0	20	0	0	2	0	0	2	0	0	4	0	2	41 (93,2%)	1 (2,3%)	2 (4,5%)
SUT	12	0	1	0	0	1	20	0	0	2	0	0	1	0	1	4	0	2	39 (88,7%)	0	5 (11,3%)

¹AMI: amicacina; CTX: cefotaxima; IPM: imipenem; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; CIP: ciprofloxacina; CAZ: ceftazidima; TET: tetraciclina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim. ^aS – susceptível; ^bI – intermediária; ^cR – resistente

5.5.4. Multirresistência

Dentre as 193 estirpes avaliadas, 14 (7,25%) foram consideradas multirresistentes, das quais sete foram isoladas do ponto 7, cinco do ponto 34 e duas do ponto 1 (**figura 21**). Os antibiotipos observados nestas estirpes estão listados na **tabela 10**. Os antimicrobianos mais associados à característica de multirresistência foram: amicacina (78,60%), cefotaxima (78,60%), ciprofloxacina (78,60%), amoxicilina-ácido clavulânico (57,14%), ceftazidima (42,80%), tetraciclina (28,60%), sulfametoxazol-trimetoprim (14,30%) e imipenem (7,10%). Entre as estirpes pertencentes ao gênero *Vibrio*, 10 (6,70%) foram consideradas multirresistentes, sendo seis oriundas do ponto 7, duas do ponto 1 e duas do ponto 34. Entre as outras quatro estirpes, uma foi identificada como *A. hydrophila* e três não foram identificadas pela metodologia de MALDI-TOF MS.

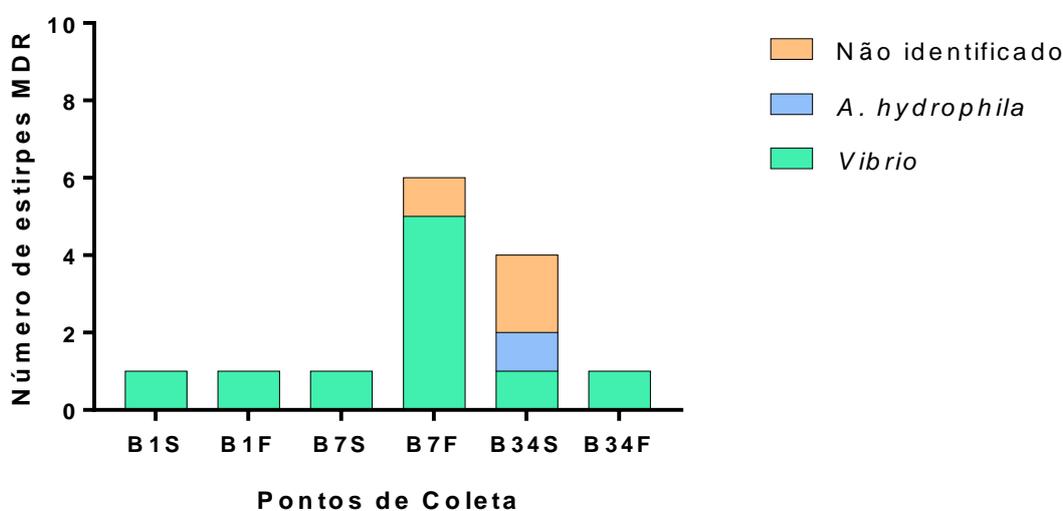


Figura 21 – Distribuição das estirpes multirresistentes em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara, tanto no fundo quanto na superfície. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.

Tabela 10 – Estirpes multirresistentes isoladas das águas da Baía de Guanabara, suas respectivas identificações obtidas por MALDI-TOF MS e seus antibiótipos

Estirpe	Identificação	Antibiótipo ¹
B1S-51	<i>V. harveyi</i>	AMC, AMI, CIP, CTX
B1F-67	<i>V. harveyi</i>	AMI, CAZ, CIP, CTX
B7S-30	<i>V. parahaemolyticus</i>	AMI, CAZ, CIP, CTX
B7F-71	<i>V. parahaemolyticus</i>	AMI, CIP, CTX
B7F-72	Não identificada	AMC, AMI, CIP, CTX
B7F-80	<i>V. harveyi</i>	AMC, AMI, CAZ, CIP, CTX
B7F-81	<i>V. harveyi</i>	AMI, CIP, CTX, SUT
B7F-82	<i>V. harveyi</i>	AMI, CAZ, CIP, CTX
B7F-84	<i>V. harveyi</i>	AMI, CIP, CTX
B34S-60	<i>A. hydrophila</i>	AMC, SUT, TET
B34S-72	<i>V. harveyi</i>	AMC, TET, SUT
B34S-80	Não identificada	AMC, AMI, SUT, TET
B34S-81	Não identificada	AMC, CAZ, CIP, CTX, SUT, TET
B34F-4	<i>V. parahaemolyticus</i>	AMC, AMI, CAZ, CIP, CTX, IPM, TET

¹AMI: amicacina; CTX: cefotaxima; IPM: imipenem; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; CIP: ciprofloxacina; CAZ: ceftazidima; TET: tetraciclina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim

Em relação ao índice MAR, 43 estirpes (22,30%) apresentam índices superiores à 0,2, entre as quais 31 (20,80%) eram pertencentes ao gênero *Vibrio*. No total, oito estirpes com índices MAR superiores à 0,2 foram isoladas do ponto 1, 16 do ponto 7 e 18 do ponto 34 (**figura 22**). Observou-se que uma estirpe (B34F-4) isolada do ponto 34 e identificada como *V. parahaemolyticus* apresentou o maior índice MAR neste estudo: 0,875. Essa estirpe foi considerada resistente à amicacina, amoxicilina-ácido clavulânico, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina e imipenem e apresentou resistência intermediária à tetraciclina, sendo susceptível apenas à sulfametoxazol-trimetoprim. Outra estirpe isolada do ponto 34, não identificada (B34S-81), apresentou o segundo maior índice MAR (0,75). Essa estirpe apresentou resistência à amoxicilina-ácido clavulânico, ciprofloxacina, cefotaxima, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina, bem como resistência intermediária à ceftazidima.

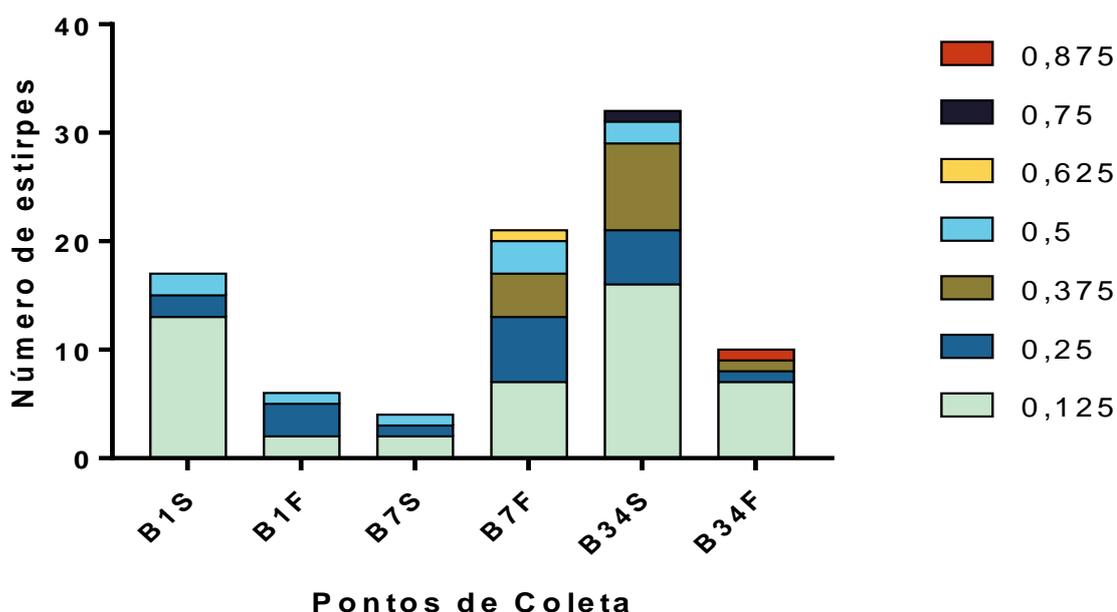


Figura 22 – Distribuição dos valores obtidos no cálculo do índice de múltipla-resistência (MAR) nos três pontos de coleta, tanto fundo quanto superfície. B1S: ponto 1 superfície; B1F: ponto 1 fundo; B7S: ponto 7 superfície; B7F: ponto 7 fundo; B34S: ponto 34 superfície; B34F: ponto 34 fundo.

5.5.5. Avaliação da produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

Visando a detecção de estirpes produtoras de ESBL, àquelas resistentes a ao menos dois beta-lactâmicos ($n = 11$) foram selecionadas para avaliação pelo método de aproximação dos discos de aztreonam, ceftriaxona, ceftazidima e cefepime com o disco de amoxicilina-ácido clavulânico.

Entre as estirpes selecionadas, seis (54,60%) foram consideradas positivas para a produção de ESBL, das quais quatro foram identificadas como *Vibrio*, uma como *Pseudomonas fragi* e uma não foi identificada pela metodologia de MALDI-TOF MS. Entre as estirpes de *Vibrio*, duas foram identificadas como *V. harveyi* e duas como *V. parahaemolyticus* (**tabela 11**). Um exemplo de resultado positivo obtido por uma estirpe de *V. parahaemolyticus* está representado na **figura 23**.

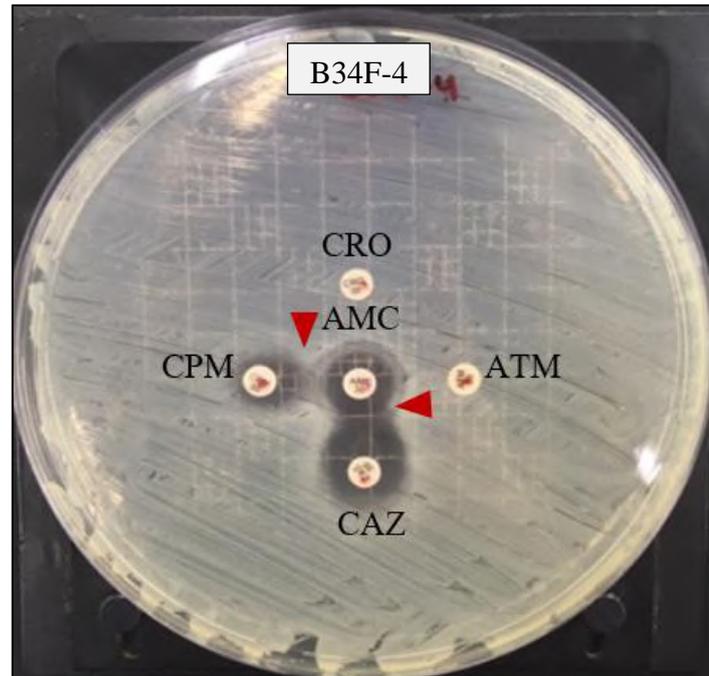


Figura 23 – Exemplo de resultado positivo no teste fenotípico para a avaliação da produção de ESBL por uma estirpe de *V. parahaemolyticus* isolada do ponto 34 na Baía de Guanabara. Setas vermelhas indicam a distorção do halo de inibição, evidenciando o sinergismo entre os antimicrobianos beta-lactâmicos e o inibidor de beta-lactamase. AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; ATM = aztreonam; CAZ = ceftazidima; CPM = cefepime; CRO = ceftriaxona.

Tabela 11 – Estirpes produtoras de ESBL, seus respectivos pontos de isolamento na Baía de Guanabara, identificação obtida por meio da metodologia de MALDI-TOF MS, seus perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e índices de múltipla resistência

Estirpe	Ponto de isolamento	Identificação por MALDI-TOF MS	Produção de ESBL	Susceptibilidade aos antimicrobianos ^a			Índice MAR
				S ¹	I ²	R ³	
B7F-82*	Ponto 7 fundo	<i>V. harveyi</i>		AMC, IPM, SUT, TET	AMI, CIP	CAZ, CTX	0,500
B34S-4	Ponto 34 superfície	<i>V. parahaemolyticus</i>		AMC, AMI, IPM, CIP, SUT, TET	-	CAZ, CTX	0,250
B34S-43	Ponto 34 superfície	<i>Pseudomonas fragi</i>	Sim	AMI, IPM, CAZ, CIP, TET	-	AMC, CTX, SUT	0,375
B34S-81	Ponto 34 superfície	Não identificada		AMI, IPM	CAZ	AMC, CIP, CTX, SUT, TET	0,750
B34F-4*	Ponto 34 fundo	<i>V. parahaemolyticus</i>		SUT	TET	AMC, AMI, CAZ, CTX, CIP, IPM	0,875
B34F-73	Ponto 34 fundo	<i>V. harveyi</i>		IPM, CIP, CAZ, SUT, TET	AMI	AMC, CTX	0,375

^aAMI: amicacina; CTX: cefotaxima; IPM: imipenem; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; CIP: ciprofloxacina; CAZ: ceftazidima; TET: tetraciclina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim. ¹S – susceptível; ²I – intermediária; ³R – resistente. * indicam estirpes multirresistentes

5.5.6. Avaliação da produção de carbapenemases

Objetivando-se avaliar a produção de carbapenemases por estirpes resistentes à imipenem (carbapenema) ($n = 2$), foi conduzido o teste modificado de Hodge. Ambas as estirpes foram isoladas do ponto 34, sendo uma oriunda da superfície e identificada por MALDI-TOF MS como *V. alginolyticus*, e a outra oriunda do fundo e identificada como *V. parahaemolyticus*. Contudo, nenhuma estirpe foi considerada positiva para a produção de carbapenemases pela metodologia empregada. Exemplos dos resultados obtidos estão representados na **figura 24**.

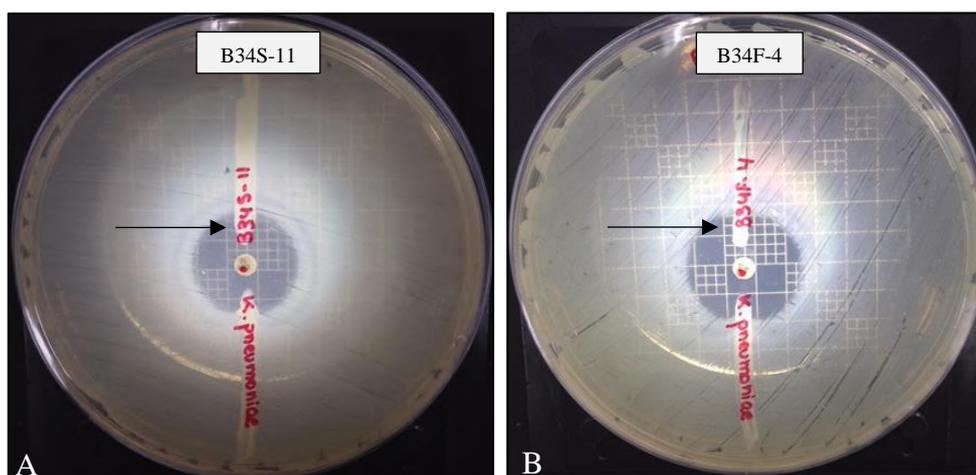


Figura 24 – Resultados obtidos no teste modificado de Hodge. Em (A) observa-se uma estirpe de *V. alginolyticus* e em (B) uma estirpe de *V. parahaemolyticus*. Em ambas, é possível observar a ausência de crescimento da estirpe de *E. coli* ATCC 25922 em direção ao disco de ertapenem (setas), indicando resultados negativos.

5.6. Condições ambientais da Baía de Guanabara

Os fatores ambientais descritos no item 4.1 foram avaliados em cada expedição de coleta em todos os três pontos analisados na Baía de Guanabara, tanto na superfície quanto no fundo. Sua distribuição amostral (valores mínimo e máximo, média e desvio-padrão) encontra-se na **tabela 12**. Em duas expedições de coleta (junho e outubro de 2018), a temperatura da água não pôde ser aferida devido ao mal funcionamento do equipamento CTD.

A temperatura média da água nos pontos de coleta analisados foi maior nos meses de março (27,49 °C) e abril (26,90 °C), enquanto os níveis de salinidade foram os menores registrados nestes meses (29,33 S e 27,43 S, respectivamente). Tanto as concentrações de fósforo total quanto de nitrogênio total foram maiores em outubro (7,64 e 194,75 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente), agosto (7,09 e 148,26 $\mu\text{mol/L}$) e junho (7,03 e 139,82 $\mu\text{mol/L}$), enquanto as menores concentrações foram detectadas em novembro (2,67 e 65,65 $\mu\text{mol/L}$), setembro (4,34 e 91,51 $\mu\text{mol/L}$) e fevereiro (4,66 e 91,60 $\mu\text{mol/L}$). Todas as contagens bacterianas (coliformes

totais e termotolerantes, bactérias heterotróficas e *E. coli*) apresentaram maiores valores em abril, quando a temperatura da água estava relativamente mais alta e a salinidade foi a segunda menor registrada no período do estudo.

Tabela 12 – Valores mínimo e máximo, média e desvio-padrão dos fatores ambientais analisados nas águas da Baía de Guanabara no período de junho de 2018 a maio de 2019

Fatores ambientais	Pontos de coleta		
	Ponto 1	Ponto 7	Ponto 34
Temperatura da água (°C)	16,8 – 27,22 (22,8 ± 3,09)	17,3 – 28,6 (23,61 ± 3,30)	22,6 – 31,0 (26,47 ± 2,59)
Temperatura do ar (°C)	21,7 – 31,80 (26,7 ± 2,70)	21,0 – 30,0 (26,45 ± 2,83)	24,6 – 33,5 (28,95 ± 2,71)
Transparência da água (m)	1,40 – 5,80 (2,94 ± 1,33)	0,60 – 5,80 (1,79 ± 1,23)	0,40 – 1,05 (0,73 ± 0,19)
Salinidade (S)	30,08 – 35,73 (33,8 ± 1,39)	26,28 – 35,10 (32,7 ± 2,21)	12,61 – 31,68 (26,12 ± 5,30)
Fósforo total (µmol/L)	0,75 – 2,74 (1,43 ± 0,57)	0,89 – 7,92 (2,34 ± 1,82)	4,59 – 28,17 (13,01 ± 7,07)
Nitrogênio total (µmol/L)	8,84 – 44,53 (24,61 ± 9,69)	9,73 – 150,35 (44,32 ± 37,7)	90,63 – 588,66 (280,85 ± 156,39)
Clorofila (µg/L)	1,07 – 28,07 (8,7 ± 7,67)	0,94 – 193,13 (22,6 ± 43,27)	7,02 – 310,07 (79,52 ± 87,20)
Feofitina (µg/L)	1,46 – 7,17 (3,17 ± 1,59)	2,28 – 19,25 (5,46 ± 4,02)	0,94 – 48,18 (15,81 ± 12,33)
Coliformes termotolerantes (NMP/100 mL)	2 – 700 (109,95 ± 172,38)	2 – 1600 (137,03 ± 365,89)	18 – 920000 (70432,18 ± 198491,08)
Coliformes totais (NMP/100 mL)	2 – 9200 (539,31 ± 1941,74)	2 – 1600 (163,42 ± 371,05)	18 – 920000 (89111,27 ± 207852,28)
<i>E. coli</i> (NMP/100 mL)	13 – 330 (68,36 ± 87,98)	2 – 920 (99,76 ± 246,47)	18 – 920000 (58911,72 ± 196373,66)
Bactérias heterotróficas (UFC/mL)	10 – 244500 (15532,63 ± 54988,25)	18 – 82500 (4142,5 ± 7526,08)	465 – 1360000 (143427,5 ± 331527,87)

O ponto 34, apresentou não somente as maiores temperaturas da água e do ar, mas também as maiores concentrações de nitrogênio e fósforo totais, clorofila, feofitina, coliformes termotolerantes e totais, *E. coli* e bactérias heterotróficas em todas as expedições de coleta. Por outro lado, o ponto 1 apresentou as menores concentrações de nitrogênio, fósforo e menores contagens de coliformes termotolerantes e *E. coli*. Este ponto também apresentou os maiores níveis de salinidade, variando de 30,09 a 35,73. Em relação ao ponto 7, este apresentou as menores contagens de coliformes totais e bactérias heterotróficas.

Determinados fatores ambientais apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as expedições de coleta, como a temperatura do ar ($p = 0,000$), temperatura da água ($p = 0,012$) e bactérias heterotróficas ($p = 0,037$). No que se refere às diferenças estatisticamente significativas entre os fatores ambientais nos diferentes pontos de coleta, estas foram observadas para a temperatura da água ($p = 0,001$), salinidade ($p = 0,000$), fósforo total ($p = 0,000$), nitrogênio total ($p = 0,000$), transparência da água ($p = 0,000$), clorofila ($p = 0,000$), feofitina ($p = 0,000$), coliformes termotolerantes ($p = 0,022$) e coliformes totais ($p = 0,002$). Os resultados estatisticamente significativos do teste *post hoc* de Tukey estão descritos nas **tabelas 13 e 14**.

Tabela 13 – Resultados do teste *post hoc* de Tukey realizado a partir dos valores estatisticamente significativos obtidos na análise de variância ANOVA *One-Way* referente à variação dos fatores ambientais em cada ponto de coleta

Teste <i>post hoc</i> de Tukey					
Fatores ambientais	Pontos de coleta	<i>p</i>-valor	Fatores ambientais	Pontos de coleta	<i>p</i>-valor
Temperatura da água	B1F - B34S	0,007	Transparência	B1S - B7S	0,019
	B1F - B34F	0,045		B1S - B7F	0,019
	B7F - B34S	0,006		B1S - B34S	0,000
	B7F - B34F	0,041		B1S - B34F	0,000
Salinidade	B1S - B34S	0,000		B1F - B7S	0,019
	B1S - B34F	0,010		B1F - B7F	0,019
	B1F - B7S	0,007		B1F - B34S	0,000
	B1F - B34S	0,000		B1F - B34F	0,000
	B7S - B34S	0,000	Clorofila	B1S - B34S	0,000
	B7F - B34S	0,000		B1F - B34S	0,000
	B7F - B34F	0,000		B7S - B34S	0,000
	B34S - B34F	0,000		B7F - B34S	0,000
Fósforo total	B1S - B34S	0,000	B34S - B34F	0,000	
	B1S - B34F	0,000	Feofitina	B1S - B34S	0,001
	B1F - B34S	0,000		B1S - B34F	0,015
	B1F - B34F	0,000		B1F - B34S	0,001
	B7S - B34S	0,000		B1F - B34F	0,007
	B7S - B34F	0,002		B7F - B34S	0,001
	B7F - B34S	0,000	B7F - B34F	0,009	
	B7F - B34F	0,000	Coliformes Termotolerantes	B1F - B34S	0,050
B34S - B34F	0,000	B7F - B34S		0,050	
Nitrogênio	B1S - B7F	0,000	Coliformes Totais	B1S - B34S	0,009
	B1S - B34S	0,000		B1F - B34S	0,009
	B1S - B34F	0,002		B7S - B34S	0,009
	B1F - B7F	0,000		B7F - B34S	0,009
	B1F - B34S	0,000		B34S - B34F	0,013
	B1F - B34F	0,001			
	B7S - B7F	0,000			
	B7S - B34S	0,000			
	B7S - B34F	0,003			
	B7F - B34F	0,000			
	B34S - B34F	0,000			

Tabela 14 – Resultados do teste *post hoc* de Tukey realizado a partir dos valores estatisticamente significativos obtidos na análise de variância ANOVA *One-Way* referente à variação dos fatores ambientais em cada expedição de coleta

Teste <i>post hoc</i> de Tukey		
Fatores ambientais	Expedições de coleta	<i>p</i>-valor
Temperatura do ar	21/06/2018 - 20/08/2018	0,010
	21/06/2018 - 02/10/2018	0,000
	21/06/2018 - 28/11/2018	0,000
	21/06/2018 - 11/12/2018	0,000
	21/06/2018 - 15/01/2019	0,000
	21/06/2018 - 12/02/2019	0,000
	21/06/2018 - 28/03/2019	0,000
	21/06/2018 - 12/04/2019	0,000
	21/06/2018 - 27/05/2019	0,013
	20/08/2018 - 02/10/2018	0,010
	20/08/2018 - 11/12/2019	0,000
	20/08/2018 - 15/01/2019	0,017
	20/08/2018 - 12/02/2019	0,000
	03/09/2018 - 02/10/2018	0,000
	03/09/2018 - 28/11/2018	0,016
	03/09/2018 - 11/12/2018	0,000
	03/09/2018 - 15/01/2019	0,000
	03/09/2018 - 12/02/2019	0,000
	03/09/2018 - 28/03/2019	0,005
	03/09/2018 - 12/04/2019	0,003
02/10/2018 - 27/05/2019	0,000	
28/11/2018 - 15/01/2019	0,000	
11/12/2018 - 15/01/2019	0,032	
11/12/2018 - 27/05/2019	0,013	
15/01/2019 - 28/03/2019	0,000	
15/01/2019 - 12/04/2019	0,001	
15/01/2019 - 27/05/2019	0,000	
12/02/2019 - 27/05/2019	0,000	
Temperatura da água	28/11/2018 - 28/03/2019	0,016
	28/11/2018 - 12/04/2019	0,039
Bactérias heterotróficas	03/09/2018 - 12/04/2019	0,042
	11/12/2018 - 12/04/2019	0,043
	15/01/2018 - 12/04/2019	0,049
	12/02/2019 - 12/04/2019	0,045

5.7. Influência dos fatores ambientais na comunidade cultivável de *Vibrio* spp.

Conforme descrito no item 5.3.6., *Vibrio* spp. foram detectados em todos os pontos de coleta na Baía de Guanabara e em todas as expedições de coleta. Observou-se que a maior quantidade de *Vibrio* spp. foi obtida na faixa de temperatura de 26 a 29 °C ($n = 69$) e na faixa de salinidade de 30 a 35 S ($n = 144$) (**figura 25 A e B**). Já em relação aos níveis de fósforo total, o maior número de *Vibrio* spp. ($n = 98$) foi isolado na faixa de 1,00 a 5,99 $\mu\text{mol/L}$ de fósforo e sua abundância diminuiu conforme as concentrações de fósforo aumentaram (**figura 25 C**). Quanto aos níveis de nitrogênio total, a maior contagem de *Vibrio* spp. foi obtida na faixa de 0,00 a 20,99 $\mu\text{mol/L}$ ($n = 62$) (**figura 25 D**). Interessantemente, o mesmo número de bactérias isoladas ($n = 32$) foi obtido nas faixas de 100,00 a 320,99 $\mu\text{mol/L}$ e de 321,00 a 600,00 $\mu\text{mol/L}$, ou seja, o aumento da concentração de nitrogênio a partir da faixa de 100,00 $\mu\text{mol/L}$ não desempenhou influência na abundância de *Vibrio* spp. neste estudo. Ademais, o maior número de *Vibrio* spp. isolados foi obtido na faixa de 0,00 a 5,99 $\mu\text{g/L}$, tanto para a clorofila quanto para feofitina e observou-se que a abundância de *Vibrio* spp. diminuiu quando estas substâncias estavam presentes em concentrações superiores à 6,00 $\mu\text{g/L}$ (**Figura 25 E e F**).

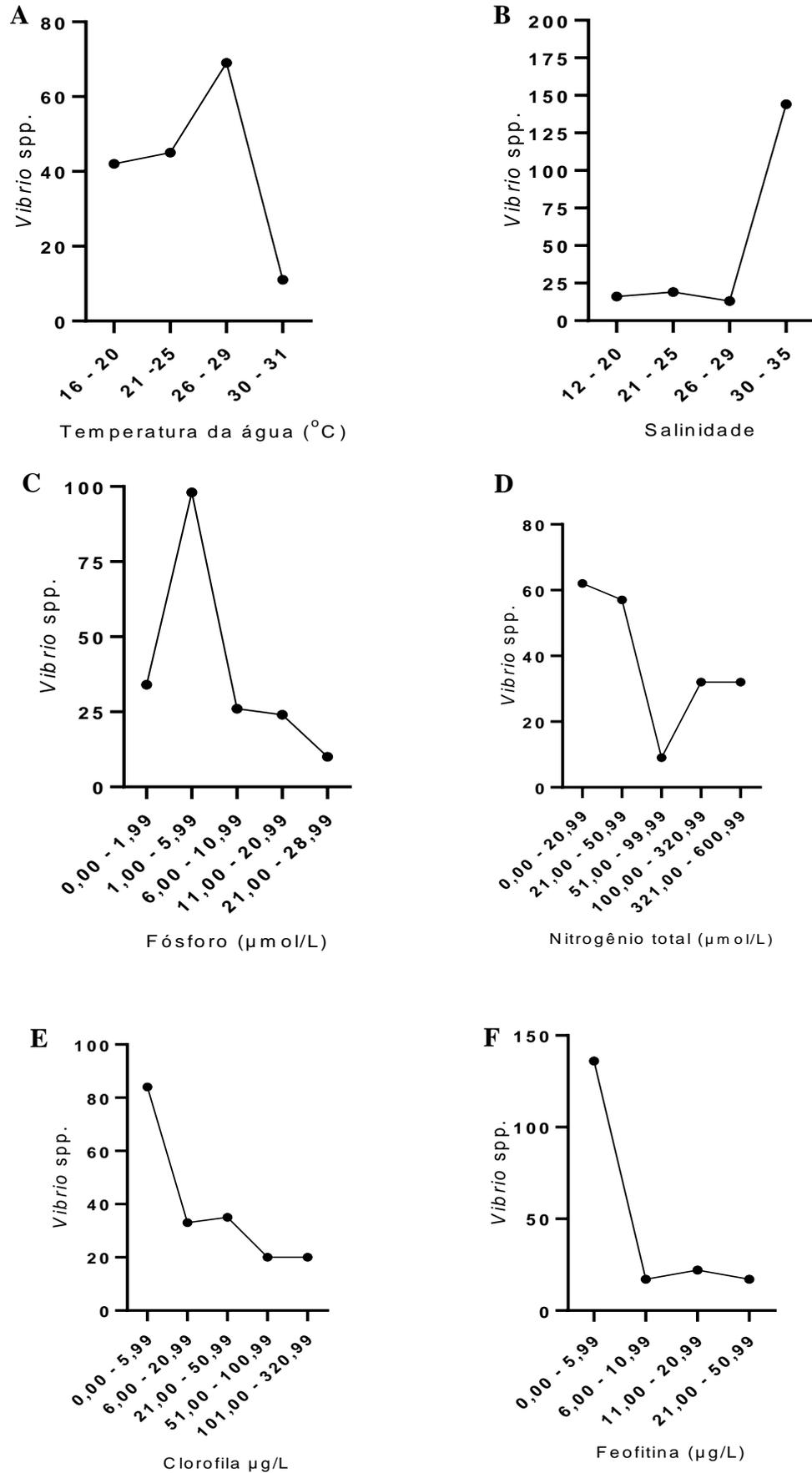


Figura 25 – Contagem total de *Vibrio* spp. identificados em diferentes faixas de temperatura da água (A), salinidade (B), fósforo total (C), nitrogênio total (D), clorofila (E) e feofitina (F).

O ponto 7 foi aquele com o maior número de *Vibrio* spp. identificados, porém não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os pontos de coleta e a abundância destas bactérias ($p = 0,245$). A maior abundância de *Vibrio* spp. foi observada no mês de março de 2019 ($n = 30$), quando a temperatura da água foi a maior registrada no período do estudo ($27,50\text{ }^{\circ}\text{C}$) enquanto a salinidade foi a segunda menor registrada ($29,93$). O mês de fevereiro foi o segundo com a maior abundância de *Vibrio* spp. ($n = 29$), seguido pelo mês de abril ($n = 27$). O mês de abril também apresentou uma das maiores temperaturas da água ($26,90\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a menor salinidade registrada ($27,40$).

A correlação de Pearson foi conduzida a fim de se determinar se os fatores ambientais exerciam alguma influência na abundância de *Vibrio* spp. e os resultados estatisticamente significativos obtidos estão descritos na **tabela 15**. Apesar de correlações terem sido detectadas nos pontos 1 e 7, nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a abundância de *Vibrio* spp. e os fatores ambientais foi detectada no ponto 34.

Tabela 15 – Correlações estatisticamente significativas detectadas por meio das correlações de Pearson entre a abundância de *Vibrio* spp. (UFC/mL) e fatores ambientais nos diferentes pontos de coleta

Ponto de coleta	<i>Vibrio</i> spp. – fatores ambientais	<i>r</i>	<i>p</i> -valor
Ponto 1 (fundo)	<i>Vibrio</i> – nitrogênio total	-0,698	0,017
	<i>Vibrio</i> – transparência da água	-0,764	0,006
Ponto 7 (superfície)	<i>Vibrio</i> – salinidade	-0,652	0,030
	<i>Vibrio</i> – clorofila	-0,656	0,028
	<i>Vibrio</i> – coliformes termotolerantes	-0,619	0,042
	<i>Vibrio</i> – coliformes totais	-0,695	0,018
Ponto 7 (fundo)	<i>Vibrio</i> – coliformes termotolerantes	-0,645	0,032
	<i>Vibrio</i> – <i>E. coli</i>	-0,648	0,031
	<i>Vibrio</i> – coliformes totais	-0,765	0,006

Quando se analisou somente a abundância de *Vibrio* spp. não-susceptíveis aos antimicrobianos, verificou-se a existência de correlações estatisticamente significativas com os fatores ambientais. Nesse sentido, observaram-se no ponto 7 (superfície) correlações positivas entre estas bactérias e clorofila ($r = 0,621$, $p = 0,041$), feofitina ($r = 0,628$, $p = 0,039$) e *E. coli* ($r = 0,615$, $p = 0,044$). Já no ponto 34 (fundo), uma correlação positiva foi observada entre a abundância de *Vibrio* spp. não-susceptíveis e clorofila ($r = 0,666$, $p = 0,025$).

Interessantemente, ao analisar a abundância de *Vibrio* spp. não-susceptível e suas correlações com fatores ambientais em cada expedição de coleta, diversas correlações positivas foram reveladas, indicando uma associação entre estas bactérias e os fatores ambientais em quatro meses (agosto, janeiro, fevereiro e maio) (**tabela 16**). No entanto, nenhuma correlação significativa foi detectada nos outros meses.

Tabela 16 – Correlação de Pearson (r) e respectivo *p*-valor entre a abundância de *Vibrio* spp. não-susceptíveis e fatores ambientais em quatro meses na Baía de Guanabara

Fatores ambientais	<i>Vibrio</i> spp. não-susceptíveis aos antimicrobianos			
	Agosto, 2018	Janeiro, 2019	Fevereiro, 2019	Mai, 2019
	r (<i>p</i> -valor)	r (<i>p</i> -valor)	r (<i>p</i> -valor)	r (<i>p</i> -valor)
Temperatura da água	0,837 (0,038*)	-0,542 (0,266)	-0,612 (0,196)	0,820 (0,046*)
Temperatura do ar	0,789 (0,062)	-0,840 (0,036*)	-0,693 (0,127)	0,956 (0,003**)
Transparência da água	0,867 (0,025*)	0,663 (0,151)	0,880 (0,021)*	-0,878 (0,021*)
Salinidade	0,865 (0,026*)	-0,517 (0,293)	-0,830 (0,041*)	0,961 (0,002**)
Fósforo total	0,862 (0,027*)	-0,507 (0,305)	-0,814 (0,049*)	0,955 (0,003**)
Nitrogênio total	-0,459 (0,359)	-0,353 (0,493)	0,698 (0,123)	-0,558 (0,25)
Clorofila	0,866 (0,026*)	-0,512 (0,299)	-0,852 (0,031*)	0,817 (0,047*)
Feofitina	0,263 (0,615)	-0,583 (0,225)	-0,791 (0,061)	0,152 (0,774)
Coliformes termotolerantes	0,804 (0,054)	-0,533 (0,276)	-0,775 (0,07)	0,936 (0,006**)
Coliformes totais	0,804 (0,054)	-0,533 (0,276)	-0,775 (0,07)	0,948 (0,004**)
<i>E. coli</i>	0,807 (0,052)	-0,533 (0,276)	-0,775 (0,07)	0,946 (0,004**)
Bactérias heterotróficas	0,801 (0,055)	-0,449 (0,371)	-0,79 (0,061)	0,944 (0,005**)

**p* < 0,05; ** *p* < 0,01

5.8. BOX-PCR

Os padrões de amplificação obtidos por BOX-PCR foram utilizados a fim de se estimar o grau de similaridade entre as estirpes identificadas como *V. harveyi* (*n* = 21) e *V. parahaemolyticus* (*n* = 9) não-susceptíveis e que permaneceram viáveis ao longo do estudo. Em relação à espécie *V. harveyi*, foram gerados perfis contendo 4 a 12 bandas, variando entre 200 e 2.000 pares de bases. As análises permitiram a divisão das estirpes em 16 grupos formados pelo UPGMA (**figura 26**). A partir disso, foram observados três grupos clonais, ou seja, apresentando *thresholds* de similaridade de 100%. O primeiro grupo (1) foi composto por três

estirpes isoladas do ponto 1 (superfície), porém em expedições de coletas distintas, possivelmente indicando a persistência destes clones nesta localização ao longo dos meses. O segundo grupo (2) foi composto de três estirpes, sendo uma isolada do ponto 7 (fundo) e duas do ponto 34 (superfície). As estirpes provenientes do ponto 34 foram isoladas na mesma expedição de coleta, enquanto a estirpe oriunda do ponto 7 foi isolada em uma expedição de coleta distinta. Já o terceiro grupo (3) foi composto por duas estirpes isoladas do ponto 7 (fundo) e na mesma expedição de coleta, possivelmente sugerindo que são relacionadas de forma clonal. Cada uma das outras 13 estirpes avaliadas formaram grupos únicos.

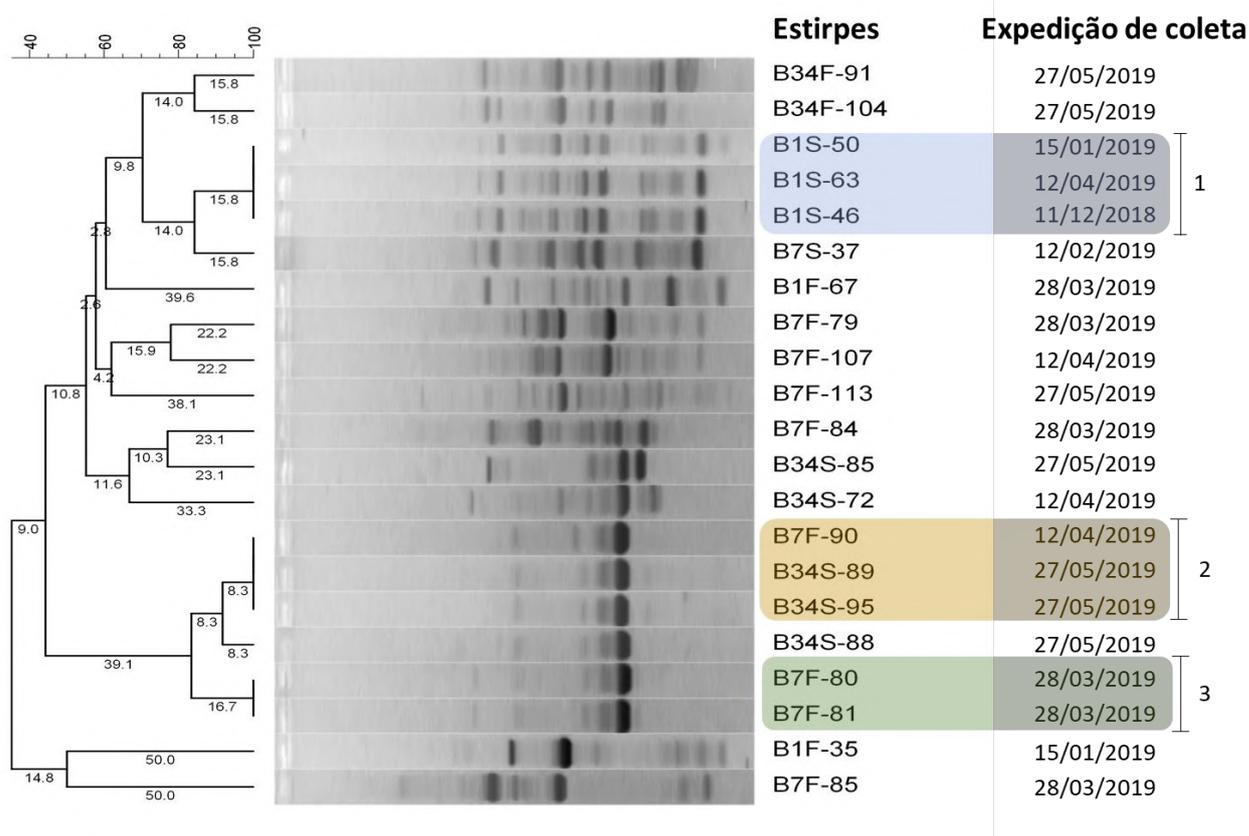


Figura 26 – Análise em cluster dos padrões de bandas obtidos nas reações de PCR conduzidas com 21 estirpes não-susceptíveis aos antimicrobianos pertencentes à espécie *V. harveyi*. Os percentuais de similaridade estão identificados no dendrograma e foram calculados com base no coeficiente Dice e agrupado pelo método UPMGA.

Já em relação à espécie *V. parahaemolyticus*, foram gerados perfis contendo 4 a 11 bandas, variando entre 200 e 2.500 pares de bases. Contudo, a análise destas estirpes não resultou em grupos clonais ao coeficiente de similaridade empregado (2%), ou seja, formaram grupos únicos (**figura 27**).

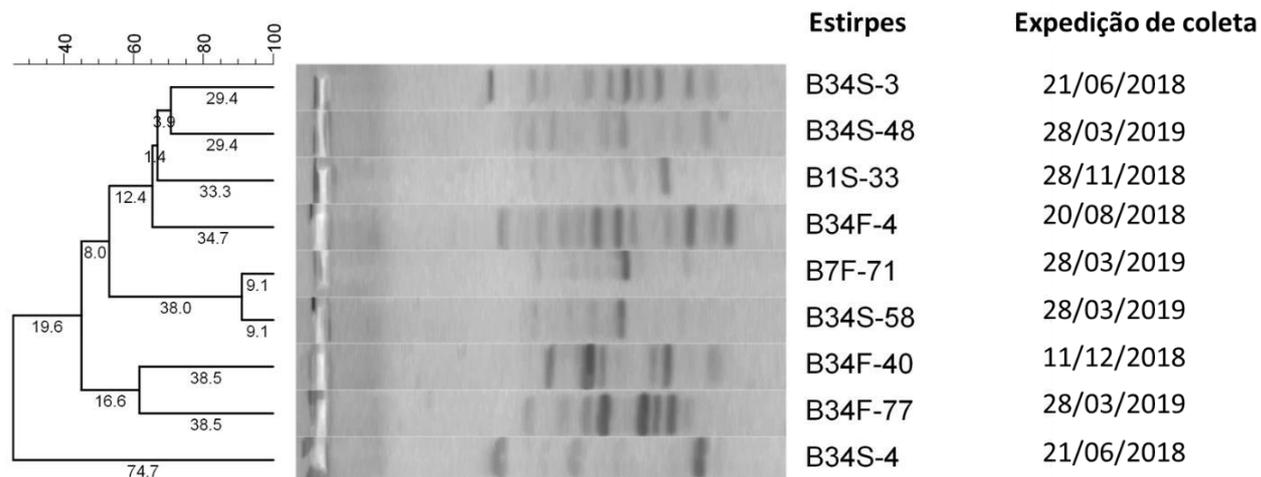


Figura 27 – Análise em cluster dos padrões de bandas obtidos nas reações de PCR conduzidas com 9 estirpes não-susceptíveis aos antimicrobianos pertencentes à espécie *V. parahaemolyticus*. Os percentuais de similaridade estão identificados no dendrograma e foram calculados com base no coeficiente Dice e agrupado pelo método UPMGA.

6. DISCUSSÃO

Em vista de sua relevância ambiental e médica, o presente projeto objetivou analisar a comunidade cultivável de *Vibrio* spp. ao longo do período de um ano nas águas da Baía de Guanabara. Estudos prévios já buscaram analisar a ocorrência e distribuição de *Vibrio* spp. como uma maneira de se avaliar os riscos da exposição humana à ambientes aquáticos. Por exemplo, Kokashvili e colaboradores (2015) descreveram a ocorrência de dez espécies patogênicas de *Vibrio* em ambientes aquáticos na Geórgia ao longo de um período de dois anos, revelando potenciais reservatórios ambientais de *Vibrio* spp., inclusive de *V. cholerae* O1 (Kokashvili *et al.*, 2015). Hackbusch e colaboradores (2020) analisaram a presença de três espécies patogênicas de *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*) ao longo de 14 meses no Mar do Norte (Europa). Os autores identificaram possíveis padrões sazonais na ocorrência de genes de virulência nessas bactérias. Assim, foi evidenciada a importância de estudos longitudinais para a melhor compreensão da dinâmica bacteriana no meio ambiente e suas potenciais ameaças à saúde humana (Hackbusch *et al.*, 2020).

No presente estudo, optou-se pela utilização do ágar TCBS para o isolamento bacteriano em virtude de este ser um meio de cultivo seletivo para o gênero *Vibrio*. Contudo, durante o desenvolvimento do trabalho foram observadas algumas limitações acerca da utilização do ágar TCBS para o isolamento de *Vibrio* spp. Primeiramente, ao submeter as colônias selecionadas à caracterização fenotípica, foi observado um número expressivo de bactérias não classificadas como bacilos gram-negativos ou catalase-positivas. Assim, os dados da coloração de Gram e teste da catalase indicaram, logo nas primeiras etapas do trabalho, a presença de outros gêneros bacterianos, além do gênero *Vibrio*.

Além disso, 42% das bactérias submetidas à identificação por MALDI-TOF MS foram identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*. Entre as estirpes identificadas, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *V. mediterranei* foram as espécies mais frequentes. Um estudo prévio na Baía de Guanabara relatou *V. parahaemolyticus* como uma das espécies mais prevalentes nessas águas, de acordo com a análise da sequência do gene *pyrH* (Gregoracci *et al.*, 2012). Contudo, relatos de *V. harveyi* e *V. mediterranei* não são recorrentes. Ambas as espécies são patógenos oportunistas de seres humanos e capazes de causar infecções em animais marinhos, como camarões, ostras, peixes, mexilhões, entre outros (Montánchez e Kaberdin, 2020; Prado *et al.*, 2020). Por outro lado, 13% das estirpes isoladas em ágar TCBS foram identificadas como pertencentes a outros gêneros bacterianos. Entre esses, os gêneros *Photobacterium* e *Aeromonas* foram os mais frequentemente isolados. *Photobacterium* é um gênero pertencente

à família *Vibrionaceae* e *Photobacterium damsela* é uma espécie patogênica tanto à animais quanto aos seres humanos. Esta espécie é comumente associada a infecções em diversas espécies de peixes e pode causar infecções em ferimentos assim como septicemia hemorrágica. Em humanos, já foram descritos casos de fascite necrosante em pacientes com doenças de base, assim como em indivíduos saudáveis (Rivas, Lemos e Osório, 2013; Guimarães *et al.*, 2020). Em relação as espécies de *Aeromonas* identificadas (*A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. veronii*), estas são consideradas patogênicas aos seres humanos, sendo capazes de causar doenças gastrointestinais, septicemia, celulite bacteriana e fascite necrosante, especialmente em pacientes imunossuprimidos. Também são importantes patógenos de animais, sendo conhecidas por causar úlceras, hemorragias e septicemia (Batra, Mathur e Misra, 2016; Fernández-Bravo e Figueras, 2020).

Outros estudos também descreveram o isolamento de bactérias não pertencentes ao gênero *Vibrio* em ágar TCBS. Em 2003, Pfeffer e Oliver, relataram que 39% das bactérias isoladas a partir de amostras de água não apresentavam as características bioquímicas básicas que permitissem sua designação ao gênero *Vibrio*, como àquelas referentes à coloração de Gram, teste da oxidase e metabolismo da glicose (Pfeffer e Oliver, 2003). Também, Kriem e colaboradores avaliaram a performance do ágar TCBS e do CHROMagar *Vibrio* no isolamento de víbrios a partir de camarões. Durante o desenvolvimento de tal estudo, foi observado que CHROMagar *Vibrio* permitiu a obtenção de um maior número de *Vibrio* spp. entre um menor número de colônias putativas, bem como permitiu a diferenciação mais eficiente de *V. parahaemolyticus* e permitiu maior taxa de recuperação. Em contrapartida, o ágar TCBS apresentou um maior número de colônias presuntivas, porém apenas 50,10% foram de fato classificadas como *Vibrio* spp. (Kriem *et al.*, 2015).

Ressalta-se também que, em alguns casos no atual projeto, a coloração das colônias em ágar TCBS não correspondeu à identificação por MALDI-TOF MS. Por exemplo, entre as espécies identificadas como *V. parahaemolyticus*, 31% apresentaram coloração amarela, contradizendo as informações do fabricante, que afirmam que esta espécie é caracterizada por colônias de coloração verde. Ainda, de acordo com a as instruções do ágar TCBS, colônias de *Pseudomonas* e *Aeromonas* devem ser parcialmente inibidas e, caso ocorra crescimento, estas devem ser caracterizadas por coloração azul. No entanto, as bactérias identificadas como pertencentes a estes gêneros apresentaram colônias verdes ou amarelas, sendo facilmente confundidas com colônias típicas de *Vibrio* spp. Já em relação às estirpes identificadas como *V. alginolyticus*, os resultados foram concordantes com o descrito pelo fabricante, ou seja,

100% das colônias identificadas por MALDI-TOF MS apresentavam coloração amarela. Contudo, os *scores* de identificação obtidos foram inferiores à 2,000, indicando que a designação de espécie é meramente sugestiva. Sendo assim, os resultados da caracterização fenotípica aliados aos resultados obtidos na metodologia de MALDI-TOF MS no presente trabalho demonstram que o ágar TCBS de fato permite o isolamento de outros gêneros bacterianos. Dessa maneira, questiona-se o poder seletivo deste meio de cultura e evidencia-se que a identificação baseada apenas nas características morfo-coloniais em ágar TCBS não é aconselhável, ressaltando-se a necessidade de testes adicionais para a confirmação da identificação bacteriana.

Destaca-se ainda o fato de que cerca de 45% das estirpes submetidas à identificação por MALDI-TOF MS apresentaram *scores* entre 0,000 e 1,699, isto é, não foram adequadamente identificadas por esta metodologia. A correta identificação de uma estirpe pela metodologia de MALDI-TOF MS está diretamente relacionada ao número de espectros de referência no banco de dados Biotyper (Wu *et al.*, 2020). Neste estudo, foi empregada a versão 3.1 do *software*, atualizada no ano de 2019. Tal versão conta com 122 espectros de referência para a família *Vibrionaceae*, 111 para o gênero *Vibrio*, 9 para a espécie *V. parahaemolyticus*, 7 para *V. harveyi*, 7 para *V. anguillarum*, entre outros. Em geral, o banco de dados é composto majoritariamente por espectros de microrganismos de origem clínica. Assim, em se tratando de bactérias de origem ambiental, a obtenção de uma identificação confiável torna-se mais difícil. Por exemplo, quando se compara o número de espectros disponíveis para *E. coli* ($n = 14$), a probabilidade desta espécie ser corretamente identificada é ligeiramente maior que a de uma espécie de *Vibrio*. Ainda assim, a técnica de MALDI-TOF MS tem se consolidado cada vez mais como uma ferramenta de identificação de microrganismos e diagnóstico, dado que é uma metodologia relativamente simples, rápida e financeiramente vantajosa, especialmente a longo prazo (Jang e Kim, 2018).

Os resultados obtidos pela identificação por MALDI-TOF MS indicaram 20 espécies distintas de *Vibrio*, dentre as quais 18 foram previamente descritas como patógenos de humanos e/ou animais marinhos. Apenas as espécies *V. pelagius* e *V. pomeroyi* não foram associadas a infecções em seres humanos ou animais. Entre os patógenos humanos destacam-se *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. navarrensis* e *V. parahaemolyticus* (Gladney *et al.*, 2014; Baker-Austin *et al.*, 2018). Já entre os patógenos de animais marinhos, foram isoladas espécies capazes de causar infecções em peixes, como *V. ichthyenteri* e *V. scopthalmi* (Tang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020b) e em ostras, como *V. gigantis* e *V. tasmaniensis* (Cánovas, Domínguez-Godino e González-Wangüemert, 2019; Robino *et al.*,

2019). Entre as outras espécies isoladas, *V. cyclitrophicus* é considerado um patógeno de mexilhões (Li *et al.*, 2019b), *V. chagasii*, de vieiras (Teng *et al.*, 2012), *V. fortis*, de cavalos-marinhos (Wang *et al.*, 2016), *V. mediterranei*, de *Pinna nobilis* (um animal bivalve) (Andree *et al.*, 2020), *V. rotiferanius* é um patógeno de esponjas (Stabili *et al.*, 2012) e *V. shilonii* é um patógeno de corais e camarões (Strauss *et al.*, 2017; Quang *et al.*, 2020). Contudo, vale ressaltar que *V. cholerae*, um dos mais proeminentes patógenos do gênero *Vibrio*, não apresenta espectros de referência no banco de dados do MALDI-TOF MS utilizado no presente estudo. Assim, a não-identificação desta espécie nas amostras de água analisadas não elimina a possibilidade de sua presença nas águas da Baía de Guanabara, como foi previamente descrito (Silva *et al.*, 2019).

Poucos são os relatos de isolamento de bactérias do gênero *Vibrio* a partir das águas da Baía de Guanabara. Em 2012, Gregoracci e colaboradores reportaram a presença de *Vibrio communis*, *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* nestas águas a partir do isolamento em ágar TCBS e análise da sequência do gene *pyrH* (Gregoracci *et al.*, 2012). Mais recentemente, Silva e colaboradores indicaram o isolamento de estirpes de *V. cholerae* e *V. vulnificus* a partir de amostras de água provenientes da Baía de Guanabara (Silva *et al.*, 2019). Em relação ao isolamento destas bactérias a partir de animais marinhos, um estudo realizado em 2008 demonstrou a presença de 14 espécies distintas de *Vibrio* em moluscos bivalves na Baía de Guanabara, entre as quais *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. mediterranei* e *V. parahaemolyticus* foram espécies em comum com o presente trabalho (Lafisca *et al.*, 2008). Também já houve o relato do isolamento de *V. vulnificus* em mexilhões nestas águas (Zebral *et al.*, 1985 *apud* Garcia Moreno e Landgraf, 1997).

Em virtude da escassez de estudos envolvendo o isolamento e caracterização de *Vibrio* spp. nas águas da Baía de Guanabara, acredita-se que o relato da ocorrência de *V. agarivorans*, *V. brasiliensis*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus*, *V. fortis*, *V. gigantis*, *V. ichthyenteri*, *V. navarrensis*, *V. pelagius*, *V. pomeroyi*, *V. rotiferanius*, *V. scopthalmi*, *V. shilloni* e *V. tasmaniensis* no presente trabalho possa ser o primeiro neste ambiente estuarino.

Dado que *Vibrio* é um gênero bacteriano constituído por representantes amplamente distribuídos em ambientes aquáticos, a exposição de seres humanos e animais marinhos a estas bactérias não é incomum. Ademais, em virtude do potencial patogênico de algumas espécies e do fato de que antimicrobianos são frequentemente utilizados no tratamento de infecções causadas por estes microrganismos, evidencia-se a pertinência da melhor compreensão de seu perfil de susceptibilidade, especialmente frente às crescentes taxas de resistência bacteriana reportadas em todo o mundo. Como mencionado no item 1.1.9, antimicrobianos pertencentes

às classes dos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina e sulfonamidas são frequentemente empregados no tratamento de infecções causadas por *Vibrio* spp. e a resistência bacteriana a estas substâncias representa uma grave ameaça à saúde humana e de animais.

No presente estudo, resistência a todos os oito antimicrobianos testados foi detectada. Entre todas as estirpes avaliadas, 34,70% foram consideradas resistentes a ao menos um antimicrobiano, enquanto 7,25% foram classificadas como multirresistentes. Ressalta-se que as maiores taxas de resistência foram observadas em relação à beta-lactâmicos, especialmente cefalosporinas de terceira geração, e aminoglicosídeos. *Vibrio* spp. resistentes a estas classes já foram descritos previamente, não apenas a partir de amostras de água, mas também a partir de peixes, camarões, ostras e sedimentos (Devi, Surendran e Chakraborty, 2009; Melo *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018; Zago *et al.*, 2020a, 2020b).

No presente estudo, avaliou-se a susceptibilidade de *Vibrio* spp. à cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima e ceftazidima), que são em geral mais ativas contra bactérias gram-negativas e microrganismos resistentes às primeiras e segundas gerações, incluindo estirpes produtoras de ESBL (Arumugham e Cascella, 2019). Os percentuais de resistência obtidos para cefotaxima e ceftazidima foram 18,10% e 7,40%, respectivamente. Relatos de *Vibrio* spp. resistentes à cefalosporinas de terceira geração são recorrentes na literatura e geralmente estão associados a estirpes isoladas de frutos do mar. A título de exemplo, Lee e colaboradores reportaram a presença de estirpes de *V. parahaemolyticus* em peixes comercializados em mercados e feiras malásios apresentando taxas de resistência de 52 e 28% à cefotaxima e à ceftazidima, respectivamente, entre as quais 2,40% apresentavam o gene *trh* (gene termoestável de hemolisina relacionado à hemolisina direta), evidenciando seu potencial patogênico (Lee *et al.*, 2018). Outro estudo realizado na Coreia do Sul, relatou estirpes de *V. parahaemolyticus* isoladas de tanques de criação de peixes apresentando taxas de resistência de 5,70 e 8,60% à cefotaxima e à ceftazidima, respectivamente, dentre as quais mais de 90% apresentavam genes codificadores de ilhas de patogenicidade (Jeong *et al.*, 2020). Alguns autores indicam que resistência de *Vibrio* spp. à cefalosporinas de terceira geração seja prevalente na Ásia e por conta da ampla utilização de antimicrobianos em aquaculturas, um setor particularmente muito bem desenvolvido nesta região (FAO, 2018; Loo *et al.*, 2020). Em contrapartida, no cenário brasileiro, Silva e colaboradores relataram que 12% das estirpes de *V. parahaemolyticus* isoladas de amostras de água utilizadas para a criação de ostras na Bahia eram resistentes à

ceftazidima, sendo este fenótipo associado à presença de plasmídios e também a genes de virulência (Silva *et al.*, 2018).

Em relação a outros antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos, destaca-se a resistência à amoxicilina associada ao ácido clavulânico (6%). Resistência a esta combinação de antimicrobianos foi descrita em estirpes isoladas a partir de frutos do mar, como foi publicado no estudo desenvolvido por Saifedden e colaboradores (2016), no qual 63,30% das estirpes de *V. parahaemolyticus* isoladas de camarões apresentavam este fenótipo (Saifedden *et al.*, 2016). Por outro lado, existem relatos na literatura de altas taxas de susceptibilidade à amoxicilina-ácido clavulânico, tal como reportado em um estudo realizado no estuário de La Rance (França) e na Baía de Chesapeake (EUA), nos quais todas as estirpes de *Vibrio* isoladas apresentaram o fenótipo de susceptibilidade (Shaw *et al.*, 2014; Baron *et al.*, 2017). Dessa maneira, infere-se que a origem das estirpes, a localização geográfica, assim como a espécie bacteriana, possivelmente influenciam o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Vale ressaltar ainda que a resistência à combinação de amoxicilina-ácido clavulânico é preocupante, dado que estirpes a ela resistentes podem ser capazes de produzir beta-lactamases de espectro estendido, fenótipo que dificulta consideravelmente o tratamento de infecções (Loo *et al.*, 2020). Com efeito, quatro entre seis estirpes produtoras de ESBL no presente estudo apresentaram resistência à esta combinação de antimicrobianos. As beta-lactamases de espectro estendido são caracterizadas por conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, mas são inibidas por inibidores de beta-lactamases clássicos como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (El Salabi, Walsh e Chouchan, 2013). Apesar da produção destas enzimas ser uma característica relativamente comum em estirpes de origem clínica, como em estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae*, sua presença em bactérias ambientais também vem sendo relatada com crescente frequência (Bush, 2018). No presente trabalho, *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus* foram as espécies de *Vibrio* capazes de produzir ESBL, duas espécies relevantes sob a perspectiva da saúde humana e animal. Estas estirpes foram isoladas dos pontos 34 e 7, locais frequentemente utilizados para atividades de recreação e de pesca, indicando os possíveis riscos associados à exposição a estas águas e/ou consumo de frutos do mar da região. Relatos prévios já demonstraram a presença de genes codificadores de beta-lactamases nestas espécies de *Vibrio* (Zheng *et al.*, 2018; Dahanayake *et al.*, 2019; Hossain *et al.*, 2020). Interessantemente, a maioria dos relatos da presença de ESBL em membros do gênero *Vibrio* se dá em estirpes isoladas de animais marinhos, especialmente aqueles destinados

ao consumo humano o que, muito possivelmente, reflete os efeitos do uso contínuo de antimicrobianos em sistemas de aquacultura.

Os resultados do presente estudo também revelaram a presença de duas estirpes resistentes à imipenem, um carbapenema. A resistência aos carbapenemas por bactérias gram-negativas é classificada pela OMS como prioridade crítica na lista de prioridades globais referente à problemática da resistência microbiana, visto que carbapenemas são antimicrobianos de última escolha no tratamento de infecções causadas, inclusive, por bactérias multirresistentes (WHO, 2017a). Relatos prévios de *Vibrio* spp. resistentes à carbapenemas não são tão frequentes e as taxas de resistência tendem a ser menores quando comparadas a outras classes de antimicrobianos, o que está de acordo com os achados do presente estudo. Por exemplo, Shaw e colaboradores (2014) reportaram que apenas 1% das estirpes de *V. vulnificus* isoladas das águas da Baía de Chesapeake (EUA) apresentaram resistência a imipenem, enquanto todas as estirpes de *V. parahaemolyticus* isoladas foram classificadas como susceptíveis (Shaw *et al.*, 2014). Também, Bier e colaboradores (2015) reportaram a presença de quatro estirpes de *V. cholerae* resistentes a imipenem isoladas de águas costeiras recreacionais na Alemanha. Tais estirpes eram simultaneamente resistentes à ampicilina, apresentavam resistência intermediária a meropenem e à amoxicilina-ácido clavulânico e foram consideradas possíveis produtoras de carbapenemases (Bier *et al.*, 2015). Por outro lado, 12% das estirpes de *V. parahaemolyticus* isoladas de peixes na Malásia apresentavam o fenótipo de resistência a imipenem, corroborando com a hipótese de que o uso de antimicrobianos ocorre de forma intensa nos sistemas de aquacultura (Lee *et al.*, 2018).

No presente trabalho, ressalta-se que as duas estirpes resistentes a imipenem foram identificadas por MALDI-TOF MS como *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*, duas espécies de relevância médica. Ambas foram isoladas no ponto 34 na Baía de Guanabara, um local frequentemente utilizado como área recreativa e de pesca, como previamente ressaltado, permitindo assim o questionamento dos riscos à saúde dos indivíduos que se expõem a estas águas. Enquanto a estirpe de *V. alginolyticus* apresentou resistência apenas a imipenem, a estirpe de *V. parahaemolyticus* também apresentou fenótipo de resistência à amicacina, amoxicilina-ácido clavulânico, ceftazidima, cefotaxima, ciprofloxacina e tetraciclina e foi considerada positiva para a produção de ESBL. A produção de carbapenemases por ambas as estirpes não foi confirmada por meio do teste modificado de Hodge, possivelmente indicando que o mecanismo de resistência a esta substância não deve ocorrer por hidrólise (Carvalhoes *et al.*, 2010). Todavia, em função da baixa especificidade do teste empregado, não se descarta a

possibilidade de produção de carbapenemases por estas estirpes. Para uma confirmação mais confiável, outros métodos mais rápidos e específicos podem ser empregados como o teste CARBA NP, Blue-Carba, ou ainda, a detecção molecular de genes de resistência, como *bla*_{NDM-1} ou *bla*_{VCC-1}, por exemplo (Hammerl *et al.*, 2017; Bir *et al.*, 2019).

Amicacina foi o antimicrobiano com a segunda maior taxa de resistência (14%) entre as bactérias do gênero *Vibrio* testadas no presente trabalho. Estudos já demonstraram expressivas taxas de resistência a este antimicrobiano em estirpes de *V. parahaemolyticus* isoladas de animais marinhos destinados ao consumo humano, como por exemplo camarões (60% de estirpes resistentes) e ostras (64% de estirpes resistentes) (Melo *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2018). Em 2015, Letchumanan e colaboradores reportaram que, entre estirpes de *Vibrio* isoladas de frutos do mar na Malásia, 81% eram resistentes à amicacina, indicando uma possível rota de transmissão de bactérias resistentes aos seres humanos (Letchumanan *et al.*, 2015). Por outro lado, relatos de estirpes de *Vibrio* resistentes isoladas a partir de amostras de água são consideravelmente menos frequentes. A título de exemplo, um estudo realizado por Shaw e colaboradores (2014) relatou que apenas 1% das estirpes de *V. vulnificus* isoladas de amostras de água provenientes de sistemas estuarinos nos Estados Unidos apresentavam o fenótipo de resistência intermediária à amicacina (Shaw *et al.*, 2014). Por outro lado, no estudo conduzido por Manjusha e Sarita (2011), aproximadamente 60% de estirpes de *Vibrio* isoladas de águas costeiras e de áreas destinadas à criação de camarões apresentavam resistência à amicacina. Além disso, este fenótipo estava associado à presença de plasmídeos e, observou-se por meio de ensaios de conjugação, que o fenótipo de resistência à amicacina e a outros antimicrobianos era capaz de ser disseminado por transferência horizontal gênica (Manjusha e Sarita, 2011). Nesse sentido, observa-se uma relação entre a maior prevalência de estirpes resistentes em ambientes de aquacultura, ressaltando a possibilidade de disseminação do fenótipo de resistência no ambiente aquático (Loo *et al.*, 2020).

Antimicrobianos pertencentes à classe das fluoroquinolonas estão entre os mais prescritos no mundo todo (Van Boeckel *et al.*, 2014). No presente estudo, 2% das estirpes analisadas foram consideradas resistentes à ciprofloxacina. Outros estudos também relataram taxas de resistência relativamente baixas em bactérias do gênero *Vibrio*, como por exemplo em estirpes isoladas de peixes e camarões (4,91%) (Lei *et al.*, 2020) e de animais marinhos em sistemas de aquacultura (0%) (Deng *et al.*, 2019). Estudos conduzidos com amostras de água também reportaram altas taxas de susceptibilidade à ciprofloxacina por diversas espécies de *Vibrio* (Shaw *et al.*, 2014, Håkonsholm *et al.*, 2020). Contudo, existe crescente preocupação

acerca da ocorrência de *Vibrio* spp. resistentes a esta classe de antimicrobianos, especialmente em sistemas de aquacultura. Com efeito, um estudo recente demonstrou que a presença de biofertilizantes no ambiente aquático foi capaz de promover o aumento da taxa de resistência de estirpes de *V. parahaemolyticus* às fluoroquinolonas em aquaculturas por meio da transferência horizontal de genes de resistência (Zhao *et al.*, 2020). Além disso, estudos realizados na Índia e Tailândia descreveram taxas de resistência de 31 e 20%, respectivamente, em estirpes de *V. parahaemolyticus* isolados de camarões, corroborando com a hipótese de que frutos do mar podem ser um vetor de bactérias resistentes (Kitiyodom *et al.*, 2010; Manjusha e Sarita, 2006).

Quanto à resistência à sulfametoxazol-trimetoprim, apenas 2% das estirpes de *Vibrio* foram classificadas como resistentes e o fenótipo de resistência intermediária a este antimicrobiano não foi observado. Este baixo percentual de resistência encontrado está de acordo com outros trabalhos na literatura (Ottaviani *et al.*, 2013; Shaw *et al.*, 2014; Håkonsholm *et al.*, 2020). Em geral, estudos que descrevem estirpes de *Vibrio* resistentes à esta combinação de antimicrobianos indicam taxas de resistência que variam entre 6% – 17% (Hernández-Robles *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2019; Loo *et al.*, 2020). Contudo, existem relatos de altas taxas de resistência, que podem chegar até 100% e estes estão geralmente associados a estirpes de origem clínica, inclusive relacionadas a surtos de cólera (Mandomando *et al.*, 2007; Lesley *et al.*, 2011).

Em relação à tetraciclina, este foi o antimicrobiano com a menor taxa de resistência detectada no presente trabalho (0,7%). Tal resultado está de acordo com outros estudos que também relataram baixos percentuais de resistência a este antimicrobiano (Shaw *et al.*, 2014; Håkonsholm *et al.*, 2020, Zago *et al.*, 2020b). No entanto, relatos de estirpes de *Vibrio* resistentes à tetraciclina são comuns. Em 2016, Hernández-Robles e colaboradores indicaram que 84% das estirpes de *V. alginolyticus* isoladas de ostras apresentavam o fenótipo de resistência a este antimicrobiano (Hernández-Robles *et al.*, 2016). Nesse sentido, outros estudos também descreveram altas taxas de resistência à tetraciclina (70 – 80%) em frutos do mar e ambientes de aquacultura, especialmente na Ásia (Noorlis *et al.*, 2011; Jun *et al.*, 2012; Loo *et al.*, 2020).

Além do gênero *Vibrio*, representantes de cinco outros gêneros bacterianos (*Aeromonas*, *Enterobacter*, *Photobacterium*, *Providencia* e *Pseudomonas*) também foram avaliados no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Resistência a pelo menos um

antimicrobiano foi observada em todos os gêneros testados. Em relação às estirpes identificadas como *Aeromonas*, as maiores taxas de resistência foram detectadas frente à amoxicilina-ácido clavulânico (38,4%), o que está de acordo com dados recentes da literatura, que relataram taxas de resistência que variavam entre 22% e 100% em estirpes isoladas de peixes e de amostras de água destinada à criação de peixes (Hoai *et al.*, 2019; Zdanowicz, Mudryk e Perliński, 2020). Ademais, estudos apontam que a incidência de bactérias do gênero *Aeromonas* em esgoto seja alta, sugerem que esta seja uma forma de disseminação destas bactérias em ambientes aquáticos (Fernández-Bravo e Figueiras, 2020). No presente estudo, ressalta-se o isolamento de uma estirpe de *A. hydrophila* que foi classificada como multirresistente devido à sua não susceptibilidade a três classes de antimicrobianos (beta-lactâmicos, tetraciclínas e sulfonamidas). Esta estirpe foi isolada no ponto 34 superfície e apresentou índice de múltipla-resistência de 0,375, corroborando com a hipótese de que o ponto 34 é impactado pelos efeitos da ação antropogênica e, muito possivelmente, recebe bactérias resistentes e patogênicas por meio do despejo de esgoto não tratado.

Recentemente, relatos de membros do gênero *Providencia* resistentes a múltiplos antimicrobianos são cada vez mais comuns. Estas bactérias são consideradas importantes patógenos emergentes e chamam a atenção especialmente pelo fato de serem capazes de carrear diversos elementos genéticos móveis que, por sua vez, contribuem para a disseminação de genes de resistência e de virulência (Iwata *et al.*, 2020; Mbelle *et al.*, 2020). Este gênero é frequentemente detectado no contexto hospitalar e está associado ao desenvolvimento de infecções no trato urinário, bacteremia, meningite, endocardite, entre outras infecções (Mbelle *et al.*, 2020). Contudo, no presente trabalho, as duas estirpes testadas apresentaram resistência somente à amoxicilina-ácido clavulânico.

Em relação às bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, destaca-se a estirpe identificada como *P. fragi*, isolada do ponto 34 superfície. Esta estirpe apresentou resistência à cefotaxima, amoxicilina-ácido clavulânico e sulfametoxazol-trimetoprim, com índice de múltipla resistência de 0,375. Além destas características, observou-se que esta estirpe apresentava o fenótipo de produção de ESBL. Relatos a respeito do perfil de resistência aos antimicrobianos e produção de ESBL por esta espécie ainda são escassos. Curiosamente, esta espécie é uma das mais frequentemente associadas à deterioração de alimentos como leite, carnes e peixes e relatos de seu isolamento em ambiente aquático são raros (Bahmid *et al.*, 2020). Já no que se refere à espécie *P. mendocina*, esta tende a ser susceptível à maioria dos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções, como aminoglicosídeos, cefalosporinas

de terceira geração, carbapenemas, fluoroquinolonas e sulfametoxazol-trimetoprim (Gani *et al.*, 2019). Contudo, a estirpe isolada no presente trabalho apresentou fenótipo de resistência intermediária à ciprofloxacina e sensibilidade a todos os outros antimicrobianos testados.

Outro gênero frequentemente isolado no presente estudo foi *Photobacterium*, cujas maiores taxas de resistência foram à amicacina. Também foi detectada resistência a beta-lactâmicos, inclusive cefalosporinas de terceira geração. Estes achados também estão de acordo com relatos recentes (Yu *et al.*, 2019; Roslan *et al.*, 2020). Em contrapartida, um dos gêneros menos frequentemente isolados foi o gênero *Enterobacter*. Ainda assim, a estirpe de *E. cloacae*, isolada no ponto 34 superfície, apresentou não-susceptibilidade à cefalosporinas de terceira geração, amoxicilina-ácido clavulânico e sulfametoxazol-trimetoprim e seu índice de múltipla-resistência foi de 0,5. Nesta espécie, a resistência às cefalosporinas de terceira geração geralmente se dá por mutações que culminam na produção constitutiva da enzima AmpC e atualmente é considerada uma grave ameaça à saúde humana por conta de suas crescentes taxas de resistência a múltiplos antimicrobianos (Annavaajhala, Gomez-Simmonds e Uhlemann, 2019).

Dentre as estirpes avaliadas nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, 7,25% foram consideradas multirresistentes. Ao contrário do que era esperado, o maior número de estirpes multirresistentes foi detectado no ponto 7 (próximo à ponte Rio-Niterói), especialmente nas amostras de águas oriundas do fundo. Por conta do grave impacto ambiental, esperava-se que o ponto 34 apresentasse maiores taxas de multirresistência. Contudo, ressalta-se que estirpes multirresistentes foram detectadas em todos os pontos de coleta, tanto no fundo quanto na superfície, e as espécies mais associadas a este fenótipo foram *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *A. hydrophila*. Nesse sentido, destaca-se a presença de estirpes de relevância médica resistentes ou ainda multirresistentes em águas recreativas no Rio de Janeiro. Tal fato assume grande importância no cenário da Baía de Guanabara, pois as atividades comerciais e recreativas aumentam consideravelmente a probabilidade do contato humano com estirpes dotadas de determinantes de virulência e resistência clinicamente relevantes, como os resultados descritos no presente trabalho e em estudos prévios, como a presença de bactérias produtoras de carbapenemases (Paschoal *et al.*, 2020). Por exemplo, um estudo conduzido em 2015 na Baía de Chesapeake (EUA) demonstrou, por meio da análise da água destinada à lavagem das mãos dos indivíduos que nadavam naquelas águas, que os mesmos eram expostos dermatologicamente a *Vibrio* spp., como *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, e que a concentração destas bactérias tendia a aumentar na pele após exposição prolongada às águas

(Shaw *et al.*, 2015). Desse modo, evidencia-se a utilização e exposição aos ambientes aquáticos como uma possível rota de transmissão destas bactérias aos seres humanos.

Soma-se a isso o fato de que a Baía de Guanabara recebe diariamente quantidades expressivas de esgoto não tratado, assim como uma miríade de outros efluentes. Contudo, existe considerável disparidade de conhecimento no que tange o monitoramento de indicadores de resistência aos antimicrobianos tanto nos efluentes que chegam neste sistema estuarino, quanto nas águas da Baía propriamente dita, de modo que os riscos associados a esta problemática ainda não são bem conhecidos neste ecossistema. O esgoto urbano já foi descrito como um reflexo da microbiota da população e estudos demonstram que sua análise é uma importante maneira de monitoramento da dinâmica de patógenos resistentes a antimicrobianos (Amos *et al.*, 2014; Newton *et al.*, 2015; Fresia *et al.*, 2019). Apesar dos esforços para melhorar os processos de tratamento de efluentes, sabe-se que os métodos existentes não são capazes de remover completamente os resíduos de antimicrobianos, bactérias e seus genes de resistência ou outros elementos genéticos (como por exemplo integrons) (Suzuki *et al.*, 2017). A presença de resíduos de antimicrobianos, mesmo em baixas concentrações no ambiente, pode promover a emergência e disseminação de resistência microbiana, notadamente por ser capaz de induzir a reposta SOS em bactérias, que por sua vez, aumenta as chances de mutação e eventos de transferência horizontal de genes (Chow, Waldron e Gillings, 2015). Nesse sentido, as bactérias mais adaptadas tendem a persistir no ambiente e disseminar a resistência aos antimicrobianos, inclusive entre bactérias de outras espécies e gêneros. Sob essa perspectiva, os resultados obtidos por BOX-PCR sugerem que grupos clonais de *V. harveyi* resistentes a antimicrobianos podem persistir ao longo dos meses nas águas da Baía de Guanabara evidenciando, assim, a pertinência de seu monitoramento.

Estirpes multirresistentes são frequentemente detectadas em hospitais no Rio de Janeiro, assim como bactérias produtoras de carbapenemases e ESBL, sendo este último um fenótipo já considerado endêmico no contexto hospitalar (Chagas *et al.*, 2011; Flores *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2019). Levando em consideração que determinantes de resistência a antimicrobianos são frequentemente detectados em elementos genéticos móveis, acredita-se que a chegada de bactérias carreadoras de tais características em corpos d'água poderia resultar em eventos de transferência horizontal entre estas bactérias e a comunidade bacteriana indígena. Nesse ínterim, ressalta-se a plasticidade genômica de membros do gênero *Vibrio*, que frequentemente carregam plasmídeos, sequências de inserção, transposons, ICEs, integrons, prófagos, ilhas genômicas, entre outros (Rajpara, Nair e Bhardwaj, 2018; Verma *et al.*, 2019;

Baker-Austin, Trinanés e Martínez-Urtaza, 2020). A recorrência destes elementos indica que vírios poderiam estar envolvidos em eventos de transferência horizontal de genes com bactérias oriundas dos efluentes que chegam nas águas da Baía de Guanabara, desempenhando um papel importante na disseminação de fenótipos de resistência e virulência.

Vale ressaltar ainda que *Vibrio* spp. são frequentemente encontrados em associação com partículas ou animais marinhos. Nesse sentido, a emergência de poluentes como microplásticos vem sendo cada vez mais considerada uma ameaça à saúde humana, dado que estas partículas são encontradas em grandes quantidades e nos mais diversos ambientes. Microplásticos são partículas com tamanho inferior à cinco milímetros capazes de adsorver poluentes, como por exemplo metais pesados, indicando que estas superfícies propiciam a formação de um ambiente com intensa pressão seletiva (Zhang *et al.*, 2020a). Além disso, sua superfície provê um habitat relativamente estável para a aderência de microrganismos, favorecendo a formação de biofilmes (Lobelle e Cunliffe, 2011). Consequentemente, microplásticos podem atuar não somente como *hotspots* para a seleção de microrganismos resistentes, mas também como vetores de sua disseminação. Recentemente, um estudo realizado na Baía de Guanabara em pontos de coleta muito próximos aqueles analisados no presente trabalho relatou altos índices de contaminação por microplásticos nestas águas (1,40 a 21,30 partículas/m³) (Olivatto *et al.*, 2019). Outro estudo realizado também na Baía de Guanabara descreveu a colonização de microplásticos por espécies de *Vibrio*, inclusive patogênicas, evidenciando que sua dispersão ocorre neste sistema estuarino (Silva *et al.*, 2019). Assim, especula-se que bactérias resistentes e com potencial patogênico, como as descritas no presente trabalho, sejam capazes de se aderir e se fixar à superfície de microplásticos, sendo capazes de serem transportadas por toda a extensão deste sistema estuarino. Em virtude de seu tamanho reduzido, microplásticos podem ser introduzidos na cadeia alimentar e ser dispersados para outros ambientes, corroborando com a hipótese de que a exposição às águas da Baía de Guanabara representa riscos à saúde humana e de animais marinhos (Olivatto *et al.*, 2019).

Frente ao cenário cada vez mais preocupante da resistência microbiana, a busca por novas substâncias antimicrobianas torna-se cada vez mais pertinente. Contudo, desde a década de 1970 a taxa de descoberta de novos fármacos vem decrescendo concomitantemente ao aumento das taxas de resistência (Hutchings, Truman e Wilkinson, 2019). Por conta do vasto número de microrganismos existentes e da extensa diversidade de metabólitos secundários que produzem, estes são considerados fontes prolíficas de novas substâncias bioativas (Gillings, Paulsen e Tetu, 2016). Com efeito, estima-se que grande parte dos antimicrobianos tenha sido

descoberta em bactérias do gênero *Streptomyces*, especialmente em estirpes oriundas de solo (Hutchings, Truman e Wilkinson, 2019). Todavia, outros ecossistemas ainda permanecem a serem mais explorados, como os ambientes aquáticos, o que torna a bioprospecção destes locais uma excelente alternativa para a detecção de novos fármacos. Nesse âmbito, o presente projeto também buscou avaliar a capacidade de produção de substâncias antimicrobianas por estirpes identificadas como *Vibrio*. Apesar de estudos prévios do nosso grupo pesquisa indicarem o potencial antimicrobiano de estirpes de bactérias deste gênero isoladas de esponjas (Santos-Gandelman *et al.*, 2014; Laport, 2017; Freitas-Silva *et al.*, 2020), nenhuma estirpe testada foi considerada positiva nas condições empregadas. Contudo, apesar de atividade antimicrobiana não ter sido detectada contra estirpes de *E. coli* e *S. aureus*, as bactérias isoladas da Baía de Guanabara ainda podem ser avaliadas quanto a capacidade de inibição de outras bactérias, até mesmo de outras estirpes patogênicas isoladas das amostras de água no presente estudo, como *Aeromonas* e *Pseudomonas*. Poucos são os relatos do potencial biotecnológico de *Vibrio* spp. na literatura, especialmente seu potencial antimicrobiano, muito possivelmente por conta da patogenicidade de determinadas espécies deste gênero. Sendo assim, grande parte das pesquisas nesta área são voltadas para a detecção de substâncias bioativas contra estirpes de *Vibrio*, sendo este um viés muito explorado no contexto dos sistemas de aquacultura (Liu *et al.*, 2020b).

Dado que o estudo de membros do gênero *Vibrio* apresenta-se como uma alternativa interessante para o monitoramento da presença de espécies patogênicas e de resistência microbiana em ambientes aquáticos, especialmente costeiros, a compreensão da interação entre os fatores ambientais e a comunidade bacteriana agrega informações que podem ser úteis para estimar os riscos à saúde humana, podendo ser uma importante ferramenta na prevenção de surtos (Hackbusch *et al.*, 2020). Ao longo do período de um ano, doze fatores ambientais foram analisados (temperatura do ar e da água, salinidade, transparência da água, fósforo total, nitrogênio total, clorofila, feofitina, contagens de coliformes termotolerantes e totais, *E. coli* e bactérias heterotróficas) em cada ponto de coleta na Baía de Guanabara. Os resultados das análises durante o período de 2018 a 2019 permitiram a divisão dos pontos de coleta analisados em dois grupos, conforme descrito por Gregoracci e colaboradores: Grupo 1, que engloba os pontos 1 e 7, representa uma região com maior influência das águas oceânicas; e Grupo 2, que equivale ao ponto 34, uma região que sofre com intenso impacto ambiental e que apresenta menores taxas de renovação de suas águas (Gregoracci *et al.*, 2012). Estes resultados também permitem inferir a existência de um gradiente de poluição desde a entrada até as áreas mais internas da Baía de Guanabara.

Em geral, o ponto 34 apresentou maiores valores referentes as temperaturas do ar e da água, fósforo total, nitrogênio total, clorofila, feofitina, coliformes totais e termotolerantes, *E. coli* e bactérias heterotróficas, ao passo que apresentava os menores valores de salinidade, transparência da água. Também, observou-se que o maior número de UFCs foi obtido no ponto 34, especialmente a partir das amostras de água da superfície, seguido pelo ponto 7 e ponto 1. Este resultado está de acordo com análises prévias nos mesmos pontos de coleta, nas quais a maior abundância de bactérias isoladas também foi obtida no ponto 34 (Paranhos *et al.*, 2001; Gregoracci *et al.*, 2012). Os altos índices de nitrogênio, fósforo, coliformes totais e termotolerantes, *E. coli* e bactérias heterotróficas neste local, somadas aos baixos valores de transparência e salinidade indicam que o mesmo está submetido a um intenso processo de eutrofização, que pode ser explicado pelas altas taxas de despejo de esgoto e menor taxa de renovação das águas. Soma-se a isso, as altas taxas de clorofila juntamente às maiores taxas de feofitina, indicam a ocorrência de fotossíntese ativa (Gregoracci *et al.*, 2012; Sarma, Krishna e Srinivasa, 2020). O processo de eutrofização é uma das causas mais comuns do comprometimento de ambientes aquáticos e sua ocorrência está relacionada à impactos na saúde humana e de animais e conseqüentemente também impactos na economia (Le Moal *et al.*, 2019).

De acordo com a resolução 274/2000 do CONAMA, as águas serão consideradas impróprias para o contato primário quando contagens superiores a 2.500 coliformes termotolerantes ou 2.000 *E. coli* forem detectadas em 100 mililitros de água analisada. Enquanto os pontos 1 e 7 atenderam estes critérios, o ponto 34 apresentou valores superiores aos estabelecidos em dez entre onze expedições de coleta de água, reforçando que este é um local submetido à forte influência antropogênica e com águas impróprias para o contato primário. Em vista das análises dos fatores ambientais, vale ressaltar que, segundo a definição proposta por Chapman (2007), determinadas regiões da Baía de Guanabara podem ser, então, consideradas contaminadas em virtude da presença de substâncias em concentrações maiores que as permitidas, e poluídas, por conta da possibilidade de efeitos biológicos adversos à saúde de seres humanos e/ou animais.

Como descrito no item 1.1.4, os fatores ambientais que tendem a apresentar correlações com a abundância de *Vibrio* em ambientes aquáticos são a temperatura da água e a salinidade. Contudo, vale mencionar que estas correlações podem variar de acordo com a região geográfica e também de acordo com a espécie analisada. No presente estudo, correlações negativas foram detectadas em relação à salinidade, o que está de acordo com outros trabalhos

(Oberbeckmann *et al.*, 2012; Coutinho *et al.*, 2019; Hackbusch *et al.*, 2020). Não foram detectadas correlações estatisticamente significativas entre a abundância de *Vibrio* e a temperatura da água, apesar desta variável ter apresentado diferenças significativas entre as expedições e pontos de coleta. Possivelmente, a não aferição da temperatura da água em dois meses (junho e outubro/2018) durante o período do estudo comprometeu o estabelecimento de correlações estatisticamente significativas nos testes de correlação de Pearson. Ainda assim, as maiores taxas de isolamento de *Vibrio* spp. ocorreram nos meses com as maiores temperaturas da água e menores salinidades (março e abril/2019). Interessantemente, o mês de setembro foi aquele com a menor taxa de isolamento de *Vibrio* spp., quando a temperatura da água estava entre as menores e a salinidade estava entre as maiores detectadas no período do estudo. Possivelmente, as razões para isso incluem o fato de que, em condições desfavoráveis, *Vibrio* spp. entram no estado “viável, mas não cultivável”, reduzindo consideravelmente sua detecção. Além disso, temperatura e salinidade são parâmetros que podem exercer influência nas vias de *quorum-sensing*. Dessa maneira, pode-se favorecer ou não a expressão de fatores de virulência, determinando maiores probabilidades de adaptação ao ambiente e/ou hospedeiro (Li *et al.*, 2019a).

Correlações entre abundância de *Vibrio* spp. e clorofila são frequentemente descritas na literatura, mas seu valor preditivo ainda não é bem estabelecido. Ao passo que estudos demonstram correlações com clorofila ainda maiores do que com a temperatura da água ou salinidade, outros trabalhos não indicam nenhuma correlação estatisticamente significativa (Oberbeckmann *et al.*, 2012; Takemura, Chien e Polz, 2014). As correlações negativas detectadas no presente estudo estão de acordo com o descrito no trabalho conduzido por Wetz e colaboradores (2014), no qual uma hipótese para a ocorrência deste fenômeno seria o fato de que a maior concentração de clorofila estaria relacionada a florações tóxicas de dinoflagelados, que inibiriam o estabelecimento de *Vibrio* spp. Por outro lado, a prevalência de correlações positivas com clorofila, frequentemente relatadas na literatura, pode se dever ao fato de que este é um pigmento indicador da densidade planctônica. Esta, por sua vez, está relacionada à disponibilidade de superfícies ricas em nutrientes as quais *Vibrio* spp. podem se aderir (Turner *et al.*, 2014; DeLuca *et al.*, 2020).

As correlações entre a abundância de *Vibrio* spp. e as contagens bacterianas (coliformes termotolerantes e totais, *E. coli* e bactérias heterotróficas) foram predominantemente negativas ou não detectadas. Isso possivelmente indica que a prevalência de indicadores de contaminação fecal pode estar relacionada a uma maior competição por

nutrientes no ambiente que pode interferir no estabelecimento de *Vibrio* spp. Contudo, ao contrário do que era esperado, não foram detectadas correlações estatisticamente significativas entre a abundância de *Vibrio* spp. e os fatores ambientais no ponto 34, sendo tais correlações observadas no ponto 7. No entanto, este cenário se alterou ao analisar-se somente a abundância de *Vibrio* spp. não susceptíveis aos antimicrobianos nos pontos de coleta, possivelmente pelo tamanho amostral empregado nas análises estatísticas.

Por fim, os altos níveis de indicadores de eutrofização e contaminação fecal associados à presença de estirpes potencialmente patogênicas resistentes e multirresistentes, evidenciam os riscos à saúde pública. Ressalta-se que o presente estudo consistiu na análise de estirpes isoladas em meio de cultura seletivo a partir de um volume pequeno de amostras de água, o que limita interpretações mais generalizadas no contexto da Baía de Guanabara. Ainda assim, características pertinentes sob a perspectiva clínica foram detectadas ao longo de todo o período do estudo, o que leva à hipótese de que tais fenótipos estejam presentes nestas águas e refletindo o processo adaptativo bacteriano em resposta à ação antropogênica. Assim sendo, salienta-se a pertinência do monitoramento de patógenos neste ambiente aquático, especialmente por meio de estudos a longo prazo e em conjunto com a análise de suas interações com variáveis ambientais, de modo a ampliar os conhecimentos acerca de sua dinâmica neste ecossistema e auxiliar na prevenção de futuras infecções e/ou surtos.

7. CONCLUSÕES

O presente projeto buscou avaliar a ocorrência, distribuição e diversidade de *Vibrio* spp. ao longo de um período de um ano em três pontos distintos na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil. A partir dos dados obtidos durante o período do estudo, pode-se concluir que:

- Bactérias do gênero *Vibrio* foram detectadas em todos os pontos analisados, tanto em amostras de água provenientes da superfície quanto do fundo, e em todas as expedições de coleta na Baía de Guanabara, indicando a presença destas bactérias em locais com características distintas e durante todo o ano.
- O meio seletivo e diferencial TCBS permitiu o crescimento de dez gêneros bacterianos, além do gênero *Vibrio*, indicando que o isolamento bacteriano neste meio de cultura deve ser seguido de caracterizações fenotípicas e/ou moleculares, a fim de se assegurar a presença de estirpes de *Vibrio*.
- A metodologia de MALDI-TOF MS identificou apenas 42,2% das estirpes avaliadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, possivelmente por conta da limitação do banco de dados do equipamento.
- Foram identificadas 20 espécies distintas de *Vibrio*, dentre as quais 14 ainda não haviam sido descritas nas águas da Baía de Guanabara.
- As espécies *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*, sabidamente patogênicas, foram detectadas em todos os pontos e expedições de coleta. Em contrapartida, determinadas espécies foram detectadas apenas em determinados pontos e expedições de coleta.
- Bactérias resistentes aos antimicrobianos foram detectadas em todas as expedições de coleta, indicando que este é um fenômeno persistente ao longo do ano, o que possivelmente sinaliza que a Baía de Guanabara possa atuar como um reservatório de resistência.
- Dentre as bactérias identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, 43% foram consideradas não-susceptíveis a ao menos um antimicrobiano, dentre os quais cefotaxima, amicacina e ceftazidima foram aqueles com as maiores taxas de não-susceptibilidade.
- O perfil fenotípico de multirresistência foi detectado em aproximadamente 6,5% das estirpes identificadas como *Vibrio*, sendo o ponto 7 aquele com a maior contagem de estirpes multirresistentes.
- Cerca de 20% das bactérias do gênero *Vibrio* apresentaram índices de múltipla-resistência superiores à 0,2, especialmente no ponto 34, sendo este um indicativo de uma fonte de alto risco de contaminação por antimicrobianos no local.

- Seis estirpes foram consideradas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido, especialmente aquelas isoladas do ponto 34.
- Entre as estirpes resistentes a imipenem, nenhuma foi considerada produtora de carbapenemase de acordo com a metodologia empregada.
- As estirpes identificadas como *Vibrio* não produziram substâncias antimicrobianas contra as estirpes de *E. coli* e *S. aureus* testadas.
- A maior taxa de isolamento de *Vibrio* spp. se deu em meses caracterizados por temperaturas da água maiores e salinidades menores.
- O ponto 34 foi considerado o local mais impactado pela ação antropogênica, seguido pelo ponto 7 e ponto 1, indicando a existência de um gradiente de poluição na Baía de Guanabara de acordo com a influência das águas do Oceano Atlântico e da maré.
- A avaliação do grau de similaridade entre estirpes não-susceptíveis de *V. harveyi* por BOX-PCR revelou a presença de grupos clonais, que possivelmente persistem ao longo dos meses nas águas da Baía de Guanabara.

Os resultados obtidos neste projeto ressaltam a pertinência do monitoramento de ambientes aquáticos como uma forma de investigar a existência de patógenos e estimar os possíveis riscos à saúde pública. As estirpes isoladas durante o período do estudo demonstram ser alvos de futuros projetos tanto no âmbito da resistência aos antimicrobianos quanto em relação ao seu potencial biotecnológico. Sendo assim, estas podem ser avaliadas quanto à presença de genes codificando fatores de virulência, genes de resistência a antimicrobianos e também a metais pesados, além da detecção de outros elementos genéticos que possam sugerir a transmissibilidade destes fenótipos, como plasmídeos e integrons. Além disso, a capacidade de produção de enzimas de relevância industrial e a avaliação da formação de biofilme são características muito pertinentes que também poderiam ser exploradas nestas estirpes. Posto isso, o estudo do gênero *Vibrio* apresenta um grande potencial e deve ser estimulado, especialmente em se tratando de bactérias isoladas de um ecossistema com a relevância ecológica e social da Baía de Guanabara.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, K., Nomura, N., Suzuki, S. (2020). Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5), fiae031.
- Aguiar, V. M. de C., Neto, J. A. B., Rangel, C. M. (2011). Eutrophication and hypoxia in four streams discharging in Guanabara Bay, RJ, Brazil, a case study. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 1915–1919.
- Ahmed, H. A., El Bayomi, R. M., Hussein, M. A., Khedr, M. H., Remela, E. M. A., El-Ashram, A. M. (2018). Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolated from crustaceans and humans. *International Journal of Food Microbiology*, 274, 31-37.
- Akpaka, P. E., Swanston, W. H. (2008). Phenotypic detection and occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* at a tertiary hospital in Trinidad Tobago. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12, 516–520.
- Alencar, E. (2016). Baía de Guanabara: descaso e resistência – 1. ed. Rio de Janeiro : Fundação Heinrich Böll / Mórula.
- Ali, E. N., El-Sonbaty, S. M., Salem, F. M. (2013). Evaluation of selenium nanoparticles as a potential chemopreventive agent against lung carcinoma. *International Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 2(4), 38-46.
- Amjad, A., Mirza, I. A., Abbasi, S. A., Farwa, U., Malik, N., Zia, F. (2011). Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(4), 189 – 193.
- Amos, G. C. A., Zhang, L., Hawkey, P. M., Gaze, W. H., Wellington, E. M. (2014). Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Veterinary Microbiology*, 171(3-4), 441-447.
- ANA (2005). Panorama da Qualidade das Águas Superficiais no Brasil. Agência Nacional de Águas, Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos. - Brasília: ANA.
- Andree, K. B., Carrasco, N., Carella, F., Furones, D., Prado, P. (2020). *Vibrio mediterranei*, a potential emerging pathogen of marine fauna: Investigation of pathogenicity using a bacterial challenge in *Pinna nobilis* and development of a species-specific PCR. *Journal of Applied Microbiology*. doi: 10.1111/jam.14756.
- Annavajhala, M. K., Gomez-Simmonds, A., Uhlemann, A. C. (2019). Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. *Frontiers in Microbiology*, 10, 44.
- ANVISA (2008). Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos: teste de Hodge modificado. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/Gram_negativos8.htm. Acesso em: 13/04/2020.
- Arumugham, V. B., Cascella, M. (2019). Third Generation Cephalosporins. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549881/>. Acesso em: 04/10/2020.
- Arunkumar, M., LewisOscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A., Nithya, C. (2020). *In vitro* and *in vivo* biofilm forming *Vibrio* sp.: A significant threat in aquaculture. *Process Biochemistry*, 94, 213-223.
- Bahmid, N. A., Heising, J., Fogliano, V., Dekker, M. (2020). Packaging design using mustard seeds as a natural antimicrobial: A study on inhibition of *Pseudomonas fragi* in liquid medium. *Foods*, 9(6), 789. <https://doi.org/10.3390/foods9060789>.
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 8, 1 – 19.
- Baker-Austin, C., Trinanés, J. A., Salmenlinna, S., Löfdahl, M., Siitonen, A., Taylor, N. G., Martinez-Urtaza, J. (2016). Heat wave associated Vibriosis, Sweden and Finland, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1216.
- Baker-Austin, C., Trinanés, J., Gonzalez-Escalona, N., Martinez-Urtaza, J. (2017). Non-Cholera vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. *Trends in Microbiology*, 25, 76–84.

- Baker-Austin, C., Trinanes, J., Martínez-Urtaza, J. (2020). The new tools revolutionising *Vibrio* science. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4096–4100.
- Baquero, F., Martínez, J. L., Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 260–265.
- Baron, S., Larvor, E., Chevalier, S., Jouy, E., Kempf, I., Granier, S. A., Lesne, J. (2017). Antimicrobial susceptibility among urban wastewater and wild shellfish isolates of non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* from La Rance Estuary (Brittany, France). *Frontiers in Microbiology*, 8, 1637.
- Batra, P., Mathur, P., Misra, M. C. (2016). *Aeromonas* spp.: an emerging nosocomial pathogen. *Journal of Laboratory Physicians*, 8(01), 001-004.
- BD Diagnostic Systems (2003). Instruções De Utilização – Meios Em Placas Prontos A Usar. BD TCBS Agar. PA-254432.02.
- Bentivoglio, M., Pacini, P. (1995). Filippo Pacini: A determined observer. *Brain Research Bulletin*, 38, 161–165.
- Bernardes Filho, F., Alves, A. D. O., Towersey, L., Hay, R., Montag, A., Coutinho, A. L., Lupi, O., Barreto, J. G., Frade, M. A. (2019). The skin health of fishermen in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Dermatology*, 58(4), 483-490.
- Bharati, K., Ganguly, N. K. (2011). Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. *Indian Journal of Medical Research*, 133(2), 179.
- Bibi, F., Yasir, M., Al-Sofyani, A., Naseer, M. I., Azhar, E. I. (2020). Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge *Suberea mollis* and bioactive metabolites of *Vibrio* sp. EA348. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(4):1139-1147.
- Bier, N., Schwartz, K., Guerra, B., Strauch, E. (2015). Survey on antimicrobial resistance patterns in *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 in Germany reveals carbapenemase-producing *Vibrio cholerae* in coastal waters. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–11.
- Bik, E. M., Bunschoten, A. E., Gouw, R. D., Mooi, F. R. (1995). Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *The EMBO Journal*, 14(2), 209-216.
- Bir, R., Mohapatra, S., Kumar, A., Tyagi, S., Sood, S., Das, B. K., Kapil, A. (2019). Comparative evaluation of in-house Carba NP test with other phenotypic tests for rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 33(1), e22652.
- Bonnin-Jusserand, M., Copin, S., Le Bris, C., Brauge, T., Gay, M., Brisabois, A., Grard, T., Midelet-Bourdin, G. (2019). *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 597–610.
- Bui T, Preuss C. V. (2020). Cephalosporins. [Updated 2020 Mar 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>. Acesso em: 16/07/2020.
- Bunpa, S., Sermwittayawong, N., Vuddhakul, V. (2016). Extracellular enzymes produced by *Vibrio alginolyticus* isolated from environments and diseased aquatic animals. *Procedia Chemistry*, 18(18), 12-17.
- Burgess, J. G. (2006). Biotechnological Applications. In: *The Biology of vibrios*. F. L. Thompson, B. Austin, and J. Swings. (Washington, ASM Press), pp.401 – 406.
- Burrus, V., Quezada-Calvillo, R., Marrero, J., Waldor, M. K. (2006). SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 3054-3057.
- Bush, K. (2018). Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10), e01076-18.

- Cánovas, F., Domínguez-Godino, J. A., González-Wangüemert, M. (2019). Epidemiology of skin ulceration disease in wild sea cucumber *Holothuria arguinensis*, a new aquaculture target species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 135(1), 77-88.
- Cardoso, A. M., Coutinho, F. H., Silveira, C. B., Ignacio, B. L., Vieira, R. P., Salloto, G. (2012). Metagenomics in polluted aquatic environments. *Water Pollution. Ri-jeka: InTech*, 89-104.
- Cardoso, V. L., Ferreira-Grise, N. M., Mafra, J. F., Duarte, E. A. A., de Oliveira, T. A. S., Evangelista-Barreto, N. S. (2018). Genes of virulence and antimicrobial resistance in *Vibrio parahaemolyticus* prevalent in areas of ostreiculture. *Boletim do Instituto de Pesca*, 44, 1–10.
- Carvalhoes, C. G., Picao, R. C., Nicoletti, A. G., Xavier, D. E., Gales, A. C. (2010). Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 249-251.
- Castro, A. M. D., Pereira Jr, N. (2010). Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, 33(1), 181-188.
- CDC (2018). One Health Basics. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>. Acesso em: 13/04/2020.
- CDC (2019). *Vibrio* species causing Vibriosis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/Vibrio/faq.html>. Acesso em: 11/04/2020.
- CEDAE (2020a). Estações de Tratamento de Alegria e Barra. Disponível em: <https://www.cedae.com.br/ETE>. Acesso em: 24/10/2020.
- CEDAE (2020b). Programa de despoluição da Baía de Guanabara – PDBG. Disponível em: https://www.cedae.com.br/despoluicao_baia_guanabara. Acesso em: 23/03/2020.
- CETESB (2014). Determinação de Clorofila a, e Feofitina a: método espectrofotométrico: fevereiro/2014, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. 093/2014/E, de 08/04/2014. Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I, v.124 (71) de 15/04/14, Poder Executivo, Seção I, p. 53-55.
- Chagas, T. P. G., Seki, L. M., Cury, J. C., Oliveira, J. A. L., Dávila, A. M. R., Silva, D. M., Asensi, M. D. (2011). Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 572-581.
- Chao, G., Jiao, X., Zhou, X., Yang, Z., Pan, Z., Huang, J., Zhou, L., Qian, X. (2009). Systematic functional pandemic strain-specific genes, three genomic islands, two T3SSs in foodborne, and clinical *Vibrio parahaemolyticus* Isolates in China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 689–698.
- Chapman, P. M. (2007). Determining when contamination is pollution—weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International*, 33(4), 492-501.
- Chatterjee, P., Kanungo, S., Bhattacharya, S. K., Dutta, S. (2020). Mapping cholera outbreaks and antibiotic resistant *Vibrio cholerae* in India: An assessment of existing data and a scoping review of the literature. *Vaccine*, 38, A93-A104.
- Chiou, J., Li, R., Chen, S. (2015). CARB-17 family of β -lactamases mediates intrinsic resistance to penicillins in *Vibrio parahaemolyticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3593-3595.
- Chow, L., Waldron, L., Gillings, M. (2015). Potential impacts of aquatic pollutants: sub-clinical antibiotic concentrations induce genome changes and promote antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 6, 803.
- Chowdhury, G., Pazhani, G. P., Sarkar, A., Rajendran, K., Mukhopadhyay, A. K., Bhattacharya, M. K., Ghosh, A., Ramamurthy, T. (2016). Carbapenem resistance in clonally distinct clinical strains of *Vibrio fluvialis* isolated from diarrheal samples. *Emerging Infectious Diseases*, 22(10), 1754-61.
- CHROMAGAR™ *VIBRIO* Leaflet. (2019). Disponível em: http://www.chromagar.com/fichiers/1557827526LF_EXT_008_VB_V6.0.pdf?PHPSESSID=066b5d3c9e6c7843415be9d4c9c2a91c. Acesso em: 28/08/2020.

- Colwell, R. R. (2006). A Global and Historical Perspective of the Genus *Vibrio*. In: The Biology of vibrios. F. L. Thompson, B. Austin, and J. Swings. (Washington, ASM Press), pp. 3 – 10.
- CONAMA nº274, de 29 de novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras Publicada no DOU nº 18, de 25 de janeiro de 2001, Seção 1, páginas 70-71.
- CONAMA nº375, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Publicada no DOU nº 053, de 18 de março de 2005, páginas 58 – 63.
- Conley, D. J., Carstensen, J., Ærtebjerg, G., Christensen, P. B., Dalsgaard, T., Hansen, J. L. S., Josefson, A. B. (2007). Long-term changes and impacts of hypoxia in Danish coastal waters. *Ecological Applications*, 17, 165–184.
- Costa, L. A. A., Pessoa, D. M. M., da Silva Carreira, R. (2018). Chemical and biological indicators of sewage river input to an urban tropical estuary (Guanabara Bay, Brazil). *Ecological Indicators*, 90, 513–518.
- Costa, W. F. (2018). Genes de resistência aos antimicrobianos e aos metais pesados em estirpes de *Vibrio* e *Shewanella* isoladas de invertebrados marinhos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 112f.
- Coutinho, F. H., Pinto, L. H., Vieira, R. P., Martins, O. B., Salloto, G. R. B., de Oliveira Santoro, D., Clementino, M. M., Cardoso, A. M. (2013). Antibiotic resistance in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. *Perspectives in Water Pollution*, 10, 54638.
- Coutinho, F. H., Silveira, C. B., Pinto, L. H., Salloto, G. R. B., Cardoso, A. M., Martins, O. B., Vieira, R. P., Clementino, M. M. (2014). Antibiotic Resistance is Widespread in Urban Aquatic Environments of Rio de Janeiro, Brazil. *Microbial Ecology*, 68, 441–452.
- Coutinho, F. H., Thompson, C. C., Cabral, A. S., Paranhos, R., Dutilh, B. E., Thompson, F. L. (2019). Modelling the influence of environmental parameters over marine planktonic microbial communities using artificial neural networks. *Science of the Total Environment*, 677, 205-214.
- Coyle, N. M., Bartie, K. L., Bayliss, S. C., Bekaert, M., Adams, A., Mcmillan, S., Verner-Jeffreys, D. W., Desbois, A. P., Feil, E. J. (2020). A Hopeful Sea-Monster: A Very Large Homologous Recombination Event Impacting the Core Genome of the Marine Pathogen *Vibrio anguillarum*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1430, 1–16.
- CLSI. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. (2010). Approved Guideline-Second Edition. CLSI document M45-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Currie, B. J., Gal, D., Mayo, M., Ward, L., Godoy, D., Spratt, B. G., LiPuma, J. J. (2007). Using BOX-PCR to exclude a clonal outbreak of melioidosis. *BMC Infectious Diseases*, 7, 1–7.
- Dahanayake, P. S., Hossain, S., Wickramanayake, M. V. K. S., Heo, G. J. (2019). Prevalence of virulence and Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) genes harboring *Vibrio* spp. isolated from cockles (*Tegillarca granosa*) marketed in Korea. *Letters in Applied Microbiology*. 71(1), 61–69.
- Das, B., Verma, J., Kumar, P., Ghosh, A., Ramamurthy, T. (2019). Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*, 38, A83–A92.
- de Carvalho, D. G., Neto, J. A. B. (2016). Microplastic pollution of the beaches of Guanabara Bay, Southeast Brazil. *Ocean & Coastal Management*, 128, 10-17.
- De Castro, A. M., Pereira, N. (2010). Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, 33, 181–188.
- Dekker, J. P., Branda, J. A. (2011). MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*, 33, 87–93.

- DeLuca, N. M., Zaitchik, B. F., Guikema, S. D., Jacobs, J. M., Davis, B. J., Curriero, F. C. (2020). Evaluation of remotely sensed prediction and forecast models for *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay. *Remote Sensing of Environment*, 250, 112016.
- Demographia World Urban Areas (2019). Built Up Urban Areas or World Agglomerations. Disponível em: <http://www.demographia.com/db-worldua.pdf>). Acesso em: 23/03/2020.
- Deng, Y., Xu, H., Su, Y., Liu, S., Xu, L., Guo, Z., Wu, J., Cheng, C., Feng, J. (2019). Horizontal gene transfer contributes to virulence and antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* 345 based on complete genome sequence analysis. *BMC Genomics*, 20, 1–19.
- Devi, R., Surendran, P. K., Chakraborty, K. (2009). Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp farms along the Southwest coast of India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 2005–2012.
- Dewi, D. A. R., Götz, B., Thomas, T. (2020). Diversity and genetic basis for carbapenem resistance in a coastal marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(10), e02939-19.
- Dikow, R. B., Smith, W. L. (2013). Genome-level homology and phylogeny of *Vibrionaceae* (*Gammaproteobacteria: Vibrionales*) with three new complete genome sequences. *BMC Microbiology*, 13(1), 80.
- Dinsdale, E. A., Pantos, O., Smriga, S., Edwards, R. A., Angly, F., Wegley, L., Hatay, M., Hall, D., Brown, E., Haynes, M., Krause, L., Sala, E., Sandin, S. A., Thurber, R. V., Willis, B. L., Azam, F., Knowlton, N., Rohwer, F. (2008). Microbial ecology of four coral atolls in the Northern Line Islands. *PloS One*, 3(2), e1584.
- Diretiva 2006/7/EC do parlamento europeu e do conselho (2006). Diretiva relativa à gestão da qualidade das águas balneares e que revoga a Diretiva 76/160/CEE. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0007&from=EM>. Acesso em: 19/11/2020.
- Eichler, P. P., Eichler, B. B., Pimenta, F. M., Pereira, E. D. R. M., Vital, H. (2014). Evaluation of environmental and ecological effects due to the accident in an oil pipe from Petrobras in Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Open Journal of Marine Science*, 4(04), 298 – 315.
- El Salabi, A., Walsh, T. R., Chouchani, C. (2013). Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(2), 113-122.
- Eliopoulos, G. M., Huovinen, P. (2001). Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), 1608-1614.
- Erler, R., Wichels, A., Heinemeyer, E. A., Hauk, G., Hippelein, M., Reyes, N. T., Gerdt, G. (2015). *VibrioBase*: A MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans. *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 16–25.
- Faja, O. M., Abd Sharad, A., Younis, K. M., Alwan, M. G., Mohammed, B. J., Ahmad, A. (2019). Isolation, detection of virulence genes, antibiotic resistance genes, plasmid profile, and molecular typing among *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Malaysian seawater from recreational beaches and fish. *Veterinary World*, 12(7), 1140–1149.
- FAO e WHO (2020). Risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* associated with seafood. *Microbiological Risk Assessment Series No. 20*. Rome.
- Farmer, J. J. (1992). The family *Vibrionaceae*. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*. In: *A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, and Applications*, 2nd ed. Springer-Verlag. Berlin, Germany, p. 2938–2951.
- Farmer, J. J., Janda, J. M., Brenner, F. W., Cameron, D. N., Birkhead, K. M. (2005). Genus I. *Vibrio* Pacini 1854. In: Brenner, D. J., Kreig, N. R., Staley, J. T., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer Science Business Media. 494–546.

- Farmer, J.J., Hickman-Brenner, F.W. (2006). The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., e Stackebrandt, E. The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria. Volume 6. 3. ed. (Singapura: Springer), pp. 508-563.
- Felis, E., Kalka, J., Sochacki, A., Kowalska, K., Bajkacz, S., Harnisz, M., Korzeniewska, E. (2020). Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment-occurrence and environmental implications. *European Journal of Pharmacology*, 866, 172813.
- Fernández-Bravo, A., Figueras, M. J. (2020). An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Microorganisms*, 8(1), 129.
- Fernández-Llamas, H., Castro, L., Blázquez, M. L., Díaz, E., Carmona, M. (2017). Speeding up bioproduction of selenium nanoparticles by using *Vibrio natriegens* as microbial factory. *Scientific Reports*, 7(1), 1-9.
- Fistarol, G. O., Coutinho, F. H., Moreira, A. P. B., Venas, T., Cánovas, A., de Paula, S. E. M., Coutinho, R., de Moura, R. L., Valentin, J. L., Tenenbaum, D. R., Paranhos, R., do Valle, R. de A. B., Vicente, A. C. P., Amado Filho, G. M., Pereira, R. C., Kruger, R., Rezende, C. E., Thompson, C. C., Salomon, P. S., Thompson, F. L. (2015). Environmental and sanitary conditions of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-17.
- Flores, C., Romão, C. M. C., Bianco, K., Miranda, C. C. D., Breves, A., Souza, A. P. S., Santos, R. M. R., Fonseca, B. O. Filippis, I., Clementino, M. M. (2016). Detection of antimicrobial resistance genes in beta-lactamase-and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by patient surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 52(5), 284-292.
- Food and Agriculture Organization (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals; FAO: The United Nations, Rome, 2018; ISBN 978-92-5-130562-1.
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., Rediers, H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 34, 643-661.
- Freitas-Silva, J., Silva-Oliveira, T., Muricy, G., Laport, M. S. (2020). *Bacillus* Strains Associated to *Homoscleromorpha* Sponges are Highly Active Against Multidrug Resistant Bacteria. *Current Microbiology*, 77, 807-815.
- Fresia, P., Antelo, V., Salazar, C., Giménez, M., D'Alessandro, B., Afshinnekoo, E., Mason, C., Gonnet, G. H., Iraola, G. (2019). Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. *Microbiome*, 7(1), 1-9.
- Frieri, M., Kumar, K., Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369-378.
- Fries, A. S., Coimbra, J. P., Nemazie, D. A., Summers, R. M., Azevedo, J. P. S., Filoso, S., Newton, M., Gelli, G., Oliveira, R. C. N., Pessoa, M. A. R., Dennison, W. C. (2019). Guanabara Bay ecosystem health report card: Science, management, and governance implications. *Regional Studies in Marine Science*, 25, 100474.
- Fu, X. T., Kim, S. M. (2010). Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Marine Drugs*, 8(1), 200-218.
- Gani, M., Rao, S., Miller, M., Scoular, S. (2019). *Pseudomonas Mendocina* Bacteremia: A Case Study and Review of Literature. *The American Journal of Case Reports*, 20, 453-458.
- Garcia Moreno, M. L., Landgraf, M. (1997). Occurrence of *Vibrio vulnificus* in seafood. *Food Science and Technology*, 17(2), 177-180.
- Gennari, M., Ghidini, V., Caburlotto, G., Lleo, M. M. (2012). Virulence genes and pathogenicity islands in environmental *Vibrio* strains non-pathogenic to humans. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3), 563-573.
- Gerba, C. P., Pepper, I. L. (2015). Municipal Wastewater Treatment. In: *Environmental Microbiology*. Pepper, I. L., Gerba, C. P., Gentry, T. J. Third Edition (Academic Press), pp. 583-662.
- Ghaly, T. M., Geoghegan, J. L., Tetu, S. G., Gillings, M. R. (2020). The Peril and Promise of Integrons: Beyond Antibiotic Resistance. *Trends in Microbiology*, 28(6), 455-464.

- Gillings, M. R., Paulsen, I. T. (2014). Microbiology of the Anthropocene. *Anthropocene*, 5, 1-8.
- Gillings, M. R., Paulsen, I. T., Tetu, S. G. (2017). Genomics and the evolution of antibiotic resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1388(1), 92-107.
- Gladkikh, A. S., Feranchuk, S. I., Ponomareva, A. S., Bochalgin, N. O., Mironova, L. V. (2020). Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during cholera complications in Siberia and the Far East of Russia. *Infection, Genetics and Evolution*, 78, 104096.
- Gladney, L. M., Katz, L. S., Knipe, K. M., Rowe, L. A., Conley, A. B., Rishishwar, L., Mariño-Ramírez, L., Jordan, K., Tarr, C. L. (2014). Genome sequences of *Vibrio navarrensis*, a potential human pathogen. *Genome Announcements*, 2(6), e01188-14.
- Gode-Potratz, C. J., Chodur, D. M., Mccarter, L. L. (2010). Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 192(22), 6025-6038.
- Gomez-Gil, B. e Roque, A. (2006). Isolation, Enumeration and Preservation of the *Vibrionaceae*. In: *The Biology of vibrios*. F. L. Thompson, B. Austin, and J. Swings. (Washington, ASM Press), pp.15-26.
- Gonçalves, V. D., Meirelles-Pereira, F., Cataldo, M., Fonseca, B. D. O., Nogueira, B. A., Olivella, J. G. B., Esteves, F. A., Guaralid, A. L. M., Andrade, A. F. B., Bello, A. R., Pereira, J. A. A. (2019). Detection of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from river waters flowing to the Guanabara Bay and from clinical samples of hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Biomédica*, 39, 135-149.
- González-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Rioseco, M. L., Vergara, J. A., Cabello, F., Romero, J., Espejo, R. T. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging infectious diseases*, 11(1), 129-131.
- Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., Karunasagar, I. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International journal of food microbiology*, 102(2), 151-159.
- Gregoracci, G. B., Nascimento, J. R., Cabral, A. S., Paranhos, R., Valentin, J. L., Thompson, C. C., Thompson, F. L. (2012). Structuring of bacterioplankton diversity in a large tropical bay. *PLoS ONE*, 7(2), e31408.
- Greig, D. R., Schaefer, U., Octavia, S., Hunter, E., Chattaway, M. A., Dallman, T. J., Jenkins, C. (2018). Evaluation of Whole-Genome Sequencing for Identification and Typing of *Vibrio cholerae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 56, 1-8.
- GTDB (2020). Genome Taxonomy Database. Disponível em: <https://gtdb.ecogenomic.org/tree>. Acesso em: 25/10/2020.
- Guimarães, D., Ribeiro, L., Vieira, L., Coelho, R. (2020). Necrotizing Fasciitis Caused by *Photobacterium damsela*: The First Case in Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 33(13).
- Hackbusch, S., Wichels, A., Gimenez, L., Döpke, H., Gerds, G. (2020). Potentially human pathogenic *Vibrio* spp. in a coastal transect: Occurrence and multiple virulence factors. *Science of the Total Environment*, 707, 136113.
- Håkonsholm, F., Lunestad, B. T., Aguirre Sánchez, J. R., Martinez-Urtaza, J., Marathe, N. P., Svanevik, C. S. (2020). Vibrios from the Norwegian marine environment: Characterization of associated antibiotic resistance and virulence genes. *MicrobiologyOpen*, e1093.
- Hammerl, J. A., Jäckel, C., Bortolaia, V., Schwartz, K., Bier, N., Hendriksen, R. S., Guerra, B., Strauch, E. (2017). Carbapenemase VCC-1-producing *Vibrio cholerae* in coastal waters of Germany. *Emerging infectious diseases*, 23(10), 1735-1737.
- Han, J. E., Mohney, L. L., Tang, K. F., Pantoja, C. R., Lightner, D. V. (2015). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports*, 2, 17-21.

- Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J., Kumagai, S. (2001). Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5819-5823.
- Hassanshahian, M. (2014). Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (*Bushehr provenance*). *Marine Pollution Bulletin*, 86(1-2), 361-366.
- Hay, S. I., Rao, P. C., Dolecek, C., Day, N. P., Stergachis, A., Lopez, A. D., Murray, C. J. (2018). Measuring and mapping the global burden of antimicrobial resistance. *BMC Medicine*, 16(1), 1-3.
- He, X., Yu, M., Wu, Y., Ran, L., Liu, W., Zhang, X. H. (2020). Two Highly Similar Chitinases from Marine *Vibrio* Species have Different Enzymatic Properties. *Marine Drugs*, 1–14.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Tettelin, Á., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Umayam, L., Gill, S. R., Nelson, K. E., Read, T. D., Richardson, D., Ermolaeva, M. D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R. D., Nierman, W. C., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Colwell, R. R., Mekalanos, J. J., Venter, J. C., Fraser, C. M. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 2000;406(6795):477-483.
- Hendren, N., Sukumar, S., Glazer, C. S. (2017). *Vibrio vulnificus* septic shock due to a contaminated tattoo. *Case Reports*, 2017, bcr-2017.
- Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S. K., Kjeldgaard, J., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Vogt, J. K., Leekitcharoenphon, P., van de Schans, M. G. M., Zuidema, T., Husman, A. M. R., Rasmussen, S., Petersen, B., Amid, C., Cochrane, G., Sicheritz-Ponten, T., Schmitt, H., Alvarez, J. R. M., Aidara-Kane, A., Pamp, S. J., Lund, O., Hald, T., Woolhouse, M., Koopmans, M. P., Vigre, H., Petersen, T. N., Aarestrup, F. M. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 10(1), 1-12.
- Hernández-Robles, M. F., Álvarez-Contreras, A. K., Juárez-García, P., Natividad-Bonifacio, I., Curiel-Quesada, E., Vázquez-Salinas, C., Quiñones-Ramírez, E. I. (2016). Virulence factors and antimicrobial resistance in environmental strains of *Vibrio alginolyticus*. *International Microbiology*, 19(4), 191-198.
- Hoai, T. D., Trang, T. T., Van Tuyen, N., Giang, N. T. H., Van Van, K. (2019). *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in channel catfish in Vietnam. *Aquaculture*, 513, 734425.
- Hoff, J., Daniel, B., Stukenberg, D., Thuronyi, B. W., Waldminghaus, T., Fritz, G. (2020). *Vibrio natriegens*: An ultrafast-growing marine bacterium as emerging synthetic biology chassis. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4394-4408.
- Hoffart, E., Grenz, S., Lange, J., Nitschel, R., Müller, F., Schwentner, A., Feith, A., Lenfers-Lücker, M., Takors, R., Blombach, B. (2017). High substrate uptake rates empower *Vibrio natriegens* as production host for industrial biotechnology. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(22), e01614-17.
- Hossain, S., Wickramanayake, M. V. K. S., Dahanayake, P. S., Heo, G. J. (2020). Occurrence of Virulence and Extended-Spectrum β -Lactamase Determinants in *Vibrio* spp. Isolated from Marketed Hard-Shelled Mussel (*Mytilus coruscus*). *Microbial Drug Resistance*, 26(4), 391-401.
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1-3), 155-170.
- Howard-Jones, N. (1984). Robert Koch and the Cholera *Vibrio*: A Centenary. *British Medical Journal*. Vol. 288, 379 – 381.
- Hugh, R. (1964). The Proposed Conservation of The Generic Name *Vibrio* Pacini 1854 and Designation of The Neotype Strain of *Vibrio Cholerae* Pacini 1854. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. Vol. 14, No. 2, pp. 87-101.
- Hurley, C. C., Quirke, A. M., Reen, F. J., Boyd, E. F. (2006). Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *BMC Genomics*, 7, 1–19.

- Hutchings, M. I., Truman, A. W., Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80.
- IBGE (2019). Rio de Janeiro. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rj/rio-de-janeiro/pesquisa/33/29168?tipo=ranking>. Acesso em: 22/03/2020.
- Iida, T., Suthienkul, O., Park, K. S., Tang, G. Q., Yamamoto, R. K., Ishibashi, M., Yamoto, K. e Honda, T. (1997). Evidence for genetic linkage between the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Medical Microbiology*, 46(8), 639-645.
- INEA (2019a). Boletim de qualidade das águas da região hidrográfica V- Baía de Guanabara – Bacia da Baía de Guanabara. Disponível em: <http://www.inea.rj.gov.br/wp-content/uploads/2019/12/Boletim-IQA-RH-V-Bacia-da-Ba%C3%ADa-de-Guanabara-2019-N4.pdf>. Acesso em: 25/04/2020.
- INEA (2019b). Histórico dos Boletins de Balneabilidade das Praias da Ilha do Governador e de Ramos – 2019. Disponível em: http://www.inea.rj.gov.br/wp-content/uploads/2019/03/ilha_do_governador_historico_2019.pdf. Acesso em: 13/04/2020.
- INEA (2020a). Como é feito o monitoramento das águas interiores? Disponível em: <http://www.inea.rj.gov.br/aragua-e-solo/como-e-feito-o-monitoramento-das-aguas-interiores/>. Acesso em: 25/04/2020.
- INEA (2020b). Superintendência Regional Baía de Guanabara (Supbg). Disponível em: <http://www.inea.rj.gov.br/Portal/MegaDropDown/Regionais/BaiadeGuanabara/index.htm%26lang=#/Destaques>. Acesso em: 13/12/2020.
- Instituto Baía de Guanabara (2015). A pesca. Disponível em: http://baiadeguanabara.org.br/site/?page_id=4779. Acesso em: 23/03/2020.
- Instituto Trata Brasil (2017). Benefícios econômicos da expansão do saneamento para a sociedade dos municípios da Baía de Guanabara. Disponível em: <https://www.casafluminense.org.br/wp-content/uploads/2017/08/TrataBrasilBaiadeGuanabara.pdf>. Acesso em: 27/04/2020.
- Instituto Trata Brasil (2018). Painel Saneamento Brasil. Disponível em: <https://www.painelsaneamento.org.br/localidade/index?id=331>. Acesso em: 26/04/2020.
- Iwamoto, M., Ayers, T., Mahon, B. E., Swerdlow, D. L. (2010). Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 399-411.
- Iwata, S., Tada, T., Hishinuma, T., Mari, T., Satoshi, O., Arai-Kuwahara, K., Ogawa, M., Shimojima, M., Kirikae, T. (2020). Emergence of carbapenem-resistant *Providencia rettgeri* and *Providencia stuartii* producing IMP-type metallo- β -lactamase in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(11), e00382-20.
- Jahid, I. K., Mizan, M. F. R., Myoung, J., Ha, S. D. (2018). *Aeromonas hydrophila* biofilm, exoprotease, and quorum sensing responses to co-cultivation with diverse foodborne pathogens and food spoilage bacteria on crab surfaces. *Biofouling*, 34(10), 1079-1092.
- Jang, H. C., Choi, S. M., Kim, H. K., Kim, S. E., Kang, S. J., Park, K. H., Ryu, P. H., Lee, T. H., Kim, Y. R., Rhee, J. H., Jung, S. I., Choy, H. E. (2014). In vivo efficacy of the combination of ciprofloxacin and cefotaxime against *Vibrio vulnificus* sepsis. *PLoS One*, 9(6), e101118.
- Jang, K. S., Kim, Y. H. (2018). Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *Journal of Microbiology*, 56(4), 209-216.
- Jeong, H. W., Kim, J. A., Jeon, S. J., Choi, S. S., Kim, M. K., Yi, H. J., Cho, S. J., Kim, I. Y., Chon, J. W., Kim, D. H., Bae, D., Kim, H., Seo, K. H. (2020). Prevalence, Antibiotic-Resistance, and Virulence Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in Restaurant Fish Tanks in Seoul, South Korea. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(3), 209-214.
- Jiang, Y., Chu, Y., Xie, G., Li, F., Wang, L., Huang, J., Zhai, Y., Yao, L. (2019). Antimicrobial resistance, virulence and genetic relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from coasts of Bohai Sea and Yellow Sea, China. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 116–124.

- Jiang, Y., Yao, L., Li, F., Tan, Z., Zhai, Y., Wang, L. (2014). Characterization of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). *Letters in Applied Microbiology*, 59, 147–154.
- Jun, J. W., Kim, J. H., Choresca Jr, C. H., Shin, S. P., Han, J. E., Han, S. Y., Chai, J. Y., Park, S. C. (2012). Isolation, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* in Korean seafood. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(3), 224-231.
- Jung, S. H., Ryu, C. M., Kim, J. S. (2019). Bacterial persistence: Fundamentals and clinical importance. *Journal of Microbiology*, 57(10), 829-835.
- Jurelevicius, D., Cotta, S. R., Montezzi, L. F., Dias, A. C., Mason, O. U., Picão, R. C., Jansson, J. K., Seldin, L. (2020). Enrichment of potential pathogens in marine microbiomes with different degrees of anthropogenic activity. *Environmental Pollution*, 115757.
- Kado, T., Kashimoto, T., Yamazaki, K., Matsuda, K., Ueno, S. (2019). Accurate prediction of anti-phagocytic activity of *Vibrio vulnificus* by measurement of bacterial adherence to hydrocarbons: Prediction of Anti-Phagocytic Activity. *APMIS*, 127(2), 80-86.
- Kalia, V. C., Kumar, P., Kumar, R., Mishra, A., Koul, S. (2015). Genome Wide Analysis for Rapid Identification of *Vibrio* Species. *Indian Journal of Microbiology*, 55(4), 375–383.
- Kannan, S., Krishnamoorthy, G., Kulanthaiyesu, A., Marudhamuthu, M. (2019). Effect of biosurfactant derived from *Vibrio natriegens* MK3 against *Vibrio harveyi* biofilm and virulence. *Journal of basic microbiology*, 59(9), 936-949.
- Kelly, M. T., Stroh, E. M. (1988). Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(9), 1754-1756.
- Ki, J. S., Zhang, R., Zhang, W., Huang, Y. L., Qian, P. Y. (2009). Analysis of RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene sequences for the discriminative power of marine *Vibrio* species. *Microbial Ecology*, 58(4), 679-691.
- Kimes, N. E., Grim, C. J., Johnson, W. R., Hasan, N. A., Tall, B. D., Kothary, M. H., Kiss, H., Munk, A. C., Tapia, R., Green, L., Detter, C., Bruce, D. C., Brettin, T. S., Colwell, R. R., Morris, P. J. (2012). Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *The ISME Journal*, 6(4), 835-846.
- Kirstein, I. V., Kirmizi, S., Wichels, A., Garin-Fernandez, A., Erler, R., Löder, M., Gerdt, G. (2016). Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Marine Environmental Research*, 120, 1-8.
- Kitiyodom, S., Khemtong, S., Wongtavatchai, J., Chuanchuen, R. (2010). Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*). *FEMS Microbiology Ecology*, 72(2), 219-227.
- Kjerfve, B., Ribeiro, C. H., Dias, G. T., Filippo, A. M., Da Silva Quaresma, V. (1997). Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental shelf research*, 17(13), 1609-1643.
- Kokashvili, T., Whitehouse, C. A., Tskhvediani, A., Grim, C. J., Elbakidze, T., Mitaishvili, N., Janelidze, N., Jaiani, E., Jaley, B. J., Lashkhi, N., Huq, A., Colwell, R. R., Tediashvili, M. (2015). Occurrence and diversity of clinically important *Vibrio* species in the aquatic environment of Georgia. *Frontiers in Public Health*, 3, 232.
- Kopprio, G. A., Streitenberger, M. E., Okuno, K., Baldini, M., Biancalana, F., Fricke, A., Martínez, A., Neogi, S. B., Koch, B. P., Yamasaki, S., Lara, R. J. (2016). Biogeochemical and hydrological drivers of the dynamics of *Vibrio* species in two Patagonian estuaries. *Science of The Total Environment*, 579, 646-656.
- Korun, J., Akgun-Dar, K., Yazici, M. (2009). Isolation of *Shewanella putrefaciens* from cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160, 532-536.
- Kothary, M. H., Babu, U. S. (2001). Infective Dose of Foodborne Pathogens in Volunteers: A Review. *Journal of Food Safety*, 21, 49–68.

- Kraemer, S. A., Ramachandran, A., Perron, G. G. (2019). Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy. *Microorganisms*, 7(6), 180.
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a027029.
- Kriem, M. R., Banni, B., El Bouchtaoui, H., Hamama, A., El Marrakchi, A., Chaouqy, N., Robert-Pillot, A., Quilici, M. L. (2015). Prevalence of *Vibrio* spp. in raw shrimps (*Parapenaeus longirostris*) and performance of a chromogenic medium for the isolation of *Vibrio* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 61(3), 224-230.
- Laboratório de Hidrobiologia UFRJ. Disponível em: <http://www.hidrobiologia.intranet.biologia.ufrj.br/baia.html>. Acesso em 30/04/2019.
- Lafisca, A., Pereira, C. S., Giaccone, V., Rodrigues, D. D. P. (2008). Enzymatic characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from bivalves harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50(4), 199-202.
- Laport, M. S. (2017). Isolating bacteria from sponges: why and how? *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18:1224–1236.
- Le Moal, M., Gascuel-Oudou, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., Moatar, F., Pannard, A., Souchu, P., Lefebvre, Pinay, G. (2019). Eutrophication: a new wine in an old bottle? *Science of the Total Environment*, 651, 1-11.
- Lee, L. H., Mutalib, N. S. A., Law, J. W. F., Wong, S. H., Letchumanan, V. (2018). Discovery on antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* in Selangor reveals carbapenemase producing *Vibrio parahaemolyticus* in marine and freshwater fish. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–13.
- Lei, T., Jiang, F., He, M., Zhang, J., Zeng, H., Chen, M., Pang, R., Wu, S., Wei, L., Wang, J., Ding, Y., Wu, Q. (2020). Prevalence, virulence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of fluoroquinolone resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from different types of food samples in China. *International Journal of Food Microbiology*, 317, 108461.
- Lesley, M. B., Velnetti, L., Cheah, Y. K., Son, R., Kasing, A., Samuel, L., Micky, V., Nishibuchi, M. (2011). Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles (*Anadara granosa*) at Tanjung Karang, Kuala Selangor. *International Food Research Journal*, 18(3), 1183-1188.
- Letchumanan, V., Pusparajah, P., Tan, L. T. H., Yin, W. F., Lee, L. H., Chan, K. G. (2015). Occurrence and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish in Selangor, Malaysia. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1417.
- Li, B., Liu, J., Zhou, S., Fu, L., Yao, P., Chen, L., Yang, Z., Wang, X., Zhang, X. H. (2020a). Vertical variation in *Vibrio* community composition in Sansha Yongle Blue Hole and its ability to degrade macromolecules. *Marine Life Science & Technology*, 2(1), 60-72.
- Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y., Jia, M. (2019a). Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiological Research*, 222, 43-51.
- Li, P., Kinch, L. N., Ray, A., Dalia, A. B., Cong, Q., Nunan, L. M., Camilli, A., Grishin, N. V., Salomon, D., Orth, K. (2017). Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(13), e00737-17.
- Li, Y. F., Chen, Y. W., Xu, J. K., Ding, W. Y., Shao, A. Q., Zhu, Y. T., Wang, C., Liang, X., Yang, J. L. (2019b). Temperature elevation and *Vibrio cyclitrophicus* infection reduce the diversity of haemolymph microbiome of the mussel *Mytilus coruscus*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-10.
- Liang, X., Wang, J. S., Liu, Y. Z., Peng, L. H., Li, Y. F., Batista, F. M., Power, D. M., Gui, L., Yang, J. (2019). Complete genome of a marine bacterium *Vibrio chagasii* ECSMB14107 with the ability to infect mussels. *Marine Genomics*, 48, 100683.
- Liu, G., Wu, S., Jin, W., Sun, C. (2016). Amy63, a novel type of marine bacterial multifunctional enzyme possessing amylase, agarase and carrageenase activities. *Scientific Reports*, 6, 18726. doi: 10.1038/srep18726.

- Liu, H., Wang, Y., Cao, J., Jiang, H., Yao, J., Gong, G., Chen, X., Xu, W., He, X. (2020b). Antimicrobial activity and virulence attenuation of citral against the fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 515, 734578.
- Liu, Y., Jin, X., Wu, C., Zhu, X., Liu, M., Call, D. R., Zhao, Z. (2020a). Genome-wide identification and functional characterization of β -agarases in *Vibrio astriarenae* strain HN897. *Frontiers in microbiology*, 11, 1404.
- Lobelle, D., Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin*, 62(1), 197-200.
- Logan, S. L., Thomas, J., Yan, J., Baker, R. P., Shields, D. S., Xavier, J. B., Brian, K. H., Parthasarathy, R. (2018). The *Vibrio cholerae* type VI secretion system can modulate host intestinal mechanics to displace gut bacterial symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16), E3779-E3787.
- Loo, K. Y., Letchumanan, V., Law, J. W. F., Pusparajah, P., Goh, B. H., Ab Mutalib, N. S., He, Y. W., Lee, L. H. (2020). Incidence of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2590-2608.
- Lotz, M. J., Tamplin, M. L., Rodrick, G. E. (1983). Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar and its selectivity for clinical and marine *Vibrio* organisms. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 13(1), 45-48.
- LPSN (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <https://www.bacterio.net/Acesso em: 01/03/2020>.
- Lu, B., Zhou, H., Li, D., Li, F., Zhu, F., Cui, Y., Huang, L., Wang, D. (2014). The first case of bacteraemia due to non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* in a type 2 diabetes mellitus patient in mainland China. *International Journal of Infectious Diseases*. 25, 116–118.
- Lukjancenko, O., Ussery, D. W. (2014). *Vibrio* chromosome-specific families. *Frontiers in Microbiology*, 5:73.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. (2010). Bacteria: As Proteobacteria. In: *Microbiologia de Brock*. 12. ed., (Porto Alegre: Artmed), pp. 398-444.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281
- Maier, T., Klepel, S., Renner, U., Kostrzewa, M. (2006). Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods*, 3(4), i-ii.
- Mandal, S., Mandal, M. D., Pal, N. K. (2011). Cholera: a great global concern. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(7), 573-580.
- Mandomando, I., Espasa, M., Vallès, X., Sacarlal, J., Sigaúque, B., Ruiz, J., Alonso, P. (2007). Antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa isolated in Manhica District Hospital, southern Mozambique. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(3), 662-664.
- Manjusha, S., Sarita, B. G. (2006). Studies on isolation and molecular characterization of plasmids from *Vibrio*. Tese de doutorado – Cochin University of Science and Technology, India.
- Manjusha, S., Sarita, G. B. (2011). Plasmid associated antibiotic resistance in *Vibrio* isolated from coastal waters of Kerala. *International Food Research Journal*, 18(3).
- Marinho, P. R., Moreira, A. P. B., Pellegrino, F. L. P. C., Muricy, G., Bastos, M. do C. de F., dos Santos, K. R. N., Giambiagi-de Marval, M., Laport, M. S. (2009). Marine *Pseudomonas putida*: A potential source of antimicrobial substances against antibiotic-resistant bacteria. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 678–682.
- Marston, H. D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N., Fauci, A. S. (2016). Antimicrobial resistance. *JAMA*, 316(11), 1193-1204.

- Matlawska-Wasowska, K., Finn, R., Mustel, A., O'Byrne, C. P., Baird, A. W., Coffey, E. T., e Boyd, A. (2010). The *Vibrio parahaemolyticus* Type III Secretion Systems manipulate host cell MAPK for critical steps in pathogenesis. *BMC Microbiology*, 10(1), 1-16.
- Mayr, L. M., Tenenbaum, D. R., Villac, M. C., Paranhos, R., Nogueira, C. R., Bonecker, S. L., Bonecker, A. C. T. (1989). Hydrobiological characterization of Guanabara bay. In *Coastlines of Brazil*, ASCE, 124-138.
- Mbelle, N. M., Osei Sekyere, J., Amoako, D. G., Maningi, N. E., Modipane, L., Essack, S. Y., Feldman, C. (2020). Genomic analysis of a multidrug-resistant clinical *Providencia rettgeri* (PR002) strain with the novel integron In1483 and an A/C plasmid replicon. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1462(1), 92-103.
- McLaughlin, J. B., DePaola, A., Bopp, C. A., Martinek, K. A., Napolilli, N. P., Allison, C. G., Murray, S. L., Thompson, E. C., Bird, M. M., Middaugh, J. P. (2005). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *New England Journal of Medicine*, 353(14), 1463-1470.
- Meise, C., Ferrand, N., Grewe, C. (2015). *Mikrobiologie*. Medi-Learn Posterreihe.
- Melo, L. M. R. de, Almeida, D., Hofer, E., Reis, C. M. F. dos, Theophilo, G. N. D., Santos, A. F. das M., Vieira, R. H. S. dos F. (2011). Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* marketed in Natal, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1463–1469.
- Ministério da Saúde (2015). Monitoramento ambiental de *Vibrio cholerae*. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/noticias/svs/19567-monitoramento-ambiental-do-vibrio-cholerae>. Acesso em: 09/05/2020.
- Ministério da Saúde. (2005). Guia de vigilância epidemiológica – 6. ed. – Brasília Ministério da Saúde.
- Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K., Yamai, S. (1969). In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 100(2), 1147.
- Montánchez, I., Kaberdin, V. R. (2020). *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. *Marine Environmental Research*, 154, 104850.
- Montezzi, L. F. (2014). Investigação da ocorrência de bacilos Gram-negativos produtores de carbapenemases e atributos de resistência associados em águas costeiras da cidade do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 82f.
- MPRJ (2019). Retrospectiva 2019: MPRJ firma acordo com a Cedae para execução de medidas do Programa de Despoluição da Baía de Guanabara. Disponível em: <https://www.mprj.mp.br/home/-/detalhe-noticia/visualizar/81428>. Acesso em: 25/04/2020.
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Mukherjee, S., Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 371–382.
- Naeem, A., Badshah, S. L., Muska, M., Ahmad, N., Khan, K. (2016). The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity. *Molecules*, 21(4), 268.
- National Geographic (2016). What's in Rio's Bay and Beaches? Disponível em: <https://www.nationalgeographic.com/news/2016/08/what-s-in-rio-s-bay/>. Acesso em: 22/03/2020.
- National Ocean Service. Tides and Water levels. Disponível em: https://oceanservice.noaa.gov/education/tutorial_tides/tides07_cycles.html. Acesso em: 11/04/2020.
- Nealson, K. H., Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, 43(4), 496-518.

- Neto, J. A. B., Barreto, C. F., Vilela, C. G., da Fonseca, E. M., Melo, G. V., Barth, O. M. (2017). Environmental change in Guanabara Bay, SE Brazil, based in microfaunal, pollen and geochemical proxies in sedimentary cores. *Ocean Coastal Management*, 143, 4-15.
- Newton, R. J., McLellan, S. L., Dila, D. K., Vineis, J. H., Morrison, H. G., Eren, A. M., Sogin, M. L. (2015). Sewage reflects the microbiomes of human populations. *MBio*, 6(2), 10.1128/mBio.02574-14.
- Noorlis, A., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K., Tuan Zainazor, T. C., Wong, W. C., Tunung, R., Pui, C. F., Nishibuchi, M., Nakaquchi, Y., Son, R. (2011). Antibiotic resistance and biosafety of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from freshwater fish at retail level. *International Food Research Journal*, 18(4), 1523-1530.
- Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T. R., Livermore, D. M. (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends in Microbiology*, 19(12), 588-595.
- Novriadi, R. (2016). Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika*, 12(1).
<http://dx.doi.org/10.20884/1.oa.2016.12.1.24>.
- Oberbeckmann, S., Fuchs, B. M., Meiners, M., Wichels, A., Wiltshire, K. H., Gerdt, G. (2012). Seasonal dynamics and modeling of a *Vibrio* community in coastal waters of the North Sea. *Microbial Ecology*, 63(3), 543-551.
- O'Boyle, N., Boyd, A. (2014). Manipulation of intestinal epithelial cell function by the cell contact-dependent type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 114.
- Odjadjare, E. E., Igbinsosa, E. O. (2017). Multi-drug resistant *Vibrio* species isolated from abattoir effluents in Nigeria. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(05), 373-378.
- Ohishi, K., Yamagishi, M., Ohta, T., Suzuki, M., Izumida, H., Sano, H., Nishijima, M., Miwa, T. (1996). Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 598-600.
- Olivatto, G. P., Martins, M. C. T., Montagner, C. C., Henry, T. B., Carreira, R. S. (2019). Microplastic contamination in surface waters in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 139, 157-162.
- Oliveira, P. M. N. D., Buonora, S. N., Souza, C. L. P., Simões Júnior, R., Silva, T. C. D., Bom, G. J. T., Teixeira, C. H. S., Silva, A. R. A. D. (2019). Surveillance of multidrug-resistant bacteria in pediatric and neonatal intensive care units in Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52.
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0205-2019>.
- Oliveira, S. M. M. C., Barcellos, F. C., Cardoso, R. L., Carvalho, P. G. M. (2014). Entorno da Baía de Guanabara: território das desigualdades demográfica e socioambiental. Trabalho apresentado no XIX Encontro Nacional de Estudos Populacionais, ABEP, realizado em São Pedro/SP – Brasil, de 24 a 28 de novembro de 2014.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Talevi, G., Masini, L., Santarelli, S., Rocchegiani, E., Susini, F., Montagna, C., Monno, R., D'Annibale, L., Manso, E., Pazzani, C. (2013). Extensive investigation of antimicrobial resistance in *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish and clinical sources, Italy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2(42), 191-193.
- Pandey, N., Cascella, M. (2020). Beta lactam antibiotics. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>. Acesso em: 17/10/2020.
- Pant, A., Das, B., Bhadra, R. K. (2020). CTX phage of *Vibrio cholerae*: Genomics and applications. *Vaccine*, 38, A7-A12.
- Paranhos, R., Andrade, L., Mendonça-Hagler, L. C., Pfeiffer, W. C. (2001). Coupling bacterial abundance with production in a polluted tropical coastal bay. *Oecologia Brasiliensis*, 9(1), 117 - 132.
- Paranhos, R., Mayr, L. M. (1993). Seasonal patterns of temperature and salinity in Guanabara Bay, Brazil. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2(11), 647-652.
- Paschoal, R. P., Campana, E. H., Castro, L. D. S., Picão, R. C. (2020). Predictors of carbapenemase-producing bacteria occurrence in polluted coastal waters. *Environmental Pollution*, 114776.

- Pascual, J., Macián, M. C., Arahál, D. R., Garay, E., Pujalte, M. J. (2010). Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 154-165.
- Pfeffer, C., Oliver, J. D. (2003). A comparison of thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar and thioulphate-chloride-iodide (TCI) agar for the isolation of *Vibrio* species from estuarine environments. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 150-151.
- Prado, P., Carrasco, N., Catanese, G., Grau, A., Cabanes, P., Carella, F., García-March, J. R., Roque, A., Bertomeu, E., Gras, N., Caiola, N., Furones, M. D., Andree, K. B. (2020). Presence of *Vibrio mediterranei* associated to major mortality in stabled individuals of *Pinna nobilis* L. *Aquaculture*, 519, 734899.
- Praja, R. K. A., Rosalina, R. (2018). Molecular Mechanism of Cholerae Toxin (ctx) in Causing Diarrhea. *Oceana Biomedicina Journal*, 1(2), 116-123.
- Quang, H. T., Thi, P. T. D., Lan, T. T., Huy, N. D., Tram, N. D. Q., Lien, N. T. T. (2020). Development of a diagnostic scar marker for *Vibrio shilonii* caused acute hepatopancreatic necrosis disease in whiteleg shrimp. *Advancements in Life Sciences*, 7(4), 257-263.
- Rada, J. P., Duarte, A. C., Pato, P., Cachada, A., Carreira, R. S. (2016). Sewage contamination of sediments from two Portuguese Atlantic coastal systems, revealed by fecal sterols. *Marine Pollution Bulletin*. 103(1-2), 319-324.
- Raghul, S. S., Bhat, S. G., Chandrasekaran, M., Francis, V., Thachil, E. T. (2014). Biodegradation of polyvinyl alcohol-low linear density polyethylene-blended plastic film by consortium of marine benthic *Vibrios*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(7), 1827-1834.
- Rajpara, N., Nair, M., Bhardwaj, A. K. (2018). A highly promiscuous integron, plasmids, extended spectrum beta lactamases and efflux pumps as factors governing multidrug resistance in a highly drug resistant *Vibrio fluvialis* Isolate BD146 from Kolkata, India. *Indian Journal of Microbiology*, 58(1), 60-67.
- Rivas, A. J., Lemos, M. L., Osorio, C. R. (2013). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Frontiers in Microbiology*, 4, 283.
- Robino, E., Poirier, A. C., Amraoui, H., Le Bissonnais, S., Perret, A., Lopez-Joven, C., Auguet, J. C., Rubio, T. P., Cazevielle, C., Rolland, J. L., Héchar, Y., Destoumieux-Garzón, D., Charrière, G. M. (2019). Resistance of the oyster pathogen *Vibrio tasmaniensis* LGP32 against grazing by *Vannella* sp. marine amoeba involves Vsm and CopA virulence factors. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4183-4197.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Machuca, J., Cano, M. E., Calvo, J., Martínez-Martínez, L., Pascual, A. (2016). Plasmid-mediated quinolone resistance: two decades on. *Drug Resistance Updates*, 29, 13-29.
- Romano, A., Gaeta, F., Poves, M. F. A., Valluzzi, R. L. (2016). Cross-reactivity among beta-lactams. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(3), 24.
- Rosa, M. F. M., Mattos, U. A. D. O. (2010). A saúde e os riscos dos pescadores e catadores de caranguejo da Baía de Guanabara. *Ciência & Saúde Coletiva*, 15, 1543-1552.
- Roslan, N. N., Ngalimat, M. S., Leow, A. T. C., Oslan, S. N., Baharum, S. N., Sabri, S. (2020). Genomic and phenomic analysis of a marine bacterium, *Photobacterium marinum* J15. *Microbiological Research*, 233, 126410.
- Ryther, J. H., Dunston, W. M., Dunstan, W. M. (2011). Nitrogen, Phosphorus, and Eutrophication in the Coastal Marine Environment. *Science*, 171, 1008–1013.
- Saifedden, G., Farinazleen, G., Nor-Khaizura, A., Kayali, A. Y., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Son, R. (2016). Antibiotic Susceptibility profile of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp in Selangor, Malaysia. *International Food Research Journal*, 23(6), 2732-2736.
- Salamone, M., Nicosia, A., Ghersi, G., Tagliavia, M. (2019). *Vibrio* proteases for biomedical applications: modulating the proteolytic secretome of *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* for improved enzymes production. *Microorganisms*, 7(10), 387. 10.3390/microorganisms7100387.

- Santos-Gandelman, J. F., Giambiagi-Demarval, M., Oelemann, W. M. R., Laport, M. S. (2014). Biotechnological potential of sponge-associated bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15:143–155.
- Sarma, V. V. S. S., Krishna, M. S., Srinivas, T. N. R. (2020). Sources of organic matter and tracing of nutrient pollution in the coastal Bay of Bengal. *Marine Pollution Bulletin*, 159, 111477.
- Seeliger, U., Kjerve, B. (2001). Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil. In: *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001, Vol. 114, pp. 107–115.
- Shaw, K. S., Goldstein, R. E. R., He, X., Jacobs, J. M., Crump, B. C., Sapkota, A. R. (2014). Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. *PLoS One*, 9(2), e89616.
- Shaw, K. S., Sapkota, A. R., Jacobs, J. M., He, X., Crump, B. C. (2015). Recreational swimmers' exposure to *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay, Maryland, USA. *Environment International*, 74, 99-105.
- Sheykhsaran, E., Baghi, H. B., Soroush, M. H., Ghotaslou, R. (2019). An overview of tetracyclines and related resistance mechanisms. *Reviews in Medical Microbiology*, 30(1), 69-75.
- Shimohata, T., Takahashi, A. (2010). Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Medical Investigation*, 57(3, 4), 179-182.
- Siboni, N., Balaraju, V., Carney, R., Labbate, M., Seymour, J. R. (2016). Spatiotemporal dynamics of *Vibrio* spp. within the Sydney Harbour estuary. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–15.
- Silva, G. L., Dourado, M. S., Candella, R. N. (2006). Estudo Preliminar da Climatologia da Ressurgência na Região de Arraial Do Cabo, RJ. 14th Congresso Brasileiro de Meteorologia, Florianópolis, 27 No-vember-1 December 2006, 1-11.
- Silva, I. P., de Souza Carneiro, C., Saraiva, M. A. F., de Oliveira, T. A. S., de Sousa, O. V., Evangelista-Barreto, N. S. (2018). Antimicrobial resistance and potential virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from water and bivalve mollusks from Bahia, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 131, 757-762.
- Silva, M. M., Maldonado, G. C., Castro, R. O., de Sá Felizardo, J., Cardoso, R. P., Anjos, R. M. dos, Araújo, F. V. de. (2019). Dispersal of potentially pathogenic bacteria by plastic debris in Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 141, 561–568.
- Silveira, D. R., Milan, C.; Rosa, J. V.; Timm, C. D. (2016). Fatores de patogenicidade de *Vibrio* spp. de importância em doenças transmitidas por alimentos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 83, 1–7.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–16.
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3(3), 155-160.
- Soares-Gomes, A., da Gama, B. A. P., Baptista Neto, J. A., Freire, D. G., Cordeiro, R. C., Machado, W., Bernardes, M. C., Coutinho, R., Thompson, F. L., Pereira, R. C. (2016). An environmental overview of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. *Regional Studies in Marine Science*, 8, 319–330.
- Stabili, L., Cardone, F., Alifano, P., Tredici, S. M., Piraino, S., Corriero, G., Gaino, E. (2012). Epidemic mortality of the sponge *Ircinia variabilis* (Schmidt, 1862) associated to proliferation of a *Vibrio* bacterium. *Microbial Ecology*, 64(3), 802-813.
- Strauss, C., Long, H., Patterson, C. E., Te, R., Lynch, M. (2017). Genome-wide mutation rate response to pH change in the coral reef pathogen *Vibrio shilonii* AK1. *MBio*, 8(4). 10.1128/mBio.01021-17
- Struelens, M. J. (1998). *Molecular Epidemiologic Typing Systems of Bacterial Pathogens: Current Issues and Perspectives*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 93, 581–585.
- Sun, J., Zhang, H., Liu, Y. H., Feng, Y. (2018). Towards understanding MCR-like colistin resistance. *Trends in Microbiology*, 26(9), 794-808.

- Suzuki, S., Pruden, A., Virta, M., Zhang, T. (2017). Antibiotic resistance in aquatic systems. *Frontiers in Microbiology*, 8, 14.
- Tacão, M., Alves, A., Saavedra, M. J., Correia, A. (2005). BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 88, 173–179.
- Takemura, A. F., Chien, D. M., Polz, M. F. (2014). Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–26.
- Tang, X., Wang, H., Liu, F., Sheng, X., Xing, J., Zhan, W. (2019). Recombinant outer membrane protein T (OmpT) of *Vibrio ichthyenteri*, a potential vaccine candidate for flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Microbial Pathogenesis*, 126, 185–192.
- Teng, W., Li, W., Zhang, M., Yu, Z., Li, S., Liu, X., Li, H., Fu, C. (2012). Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio chagasii* from *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Fisheries of China*, 36(6), 937–943.
- Thompson, F. L., Austin, B., Swings, J. (2006). Conclusions. In: *The Biology of vibrios*. (Washington, ASM Press), pp.409–416.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1–4), 37–61.
- Toska, J., Ho, B. T., Mekalanos, J. J. (2018). Exopolysaccharide protects *Vibrio cholerae* from exogenous attacks by the type 6 secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, 7997–8002.
- Towse, Stephen James. Antimicrobial activity of marine *Vibrio* sp., isolate NI-22. 2005. Tese de Doutorado. Department of Biology, University of Winnipeg, 33f.
- Turner, J. W., Malayil, L., Guadagnoli, D., Cole, D., Lipp, E. K. (2014). Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* with respect to seasonal fluctuations in temperature and plankton abundance. *Environmental Microbiology*, 16(4), 1019–1028.
- UCLA (2020). Department of Epidemiology (Fielding School of Public Health) Who first discovered *Vibrio cholerae*? Disponível em: <https://www.ph.ucla.edu/epi/snow/firstdiscoveredcholera.html>. Acesso em: 19/03/2020.
- Ulitzur, S. (1974). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*: Short generation-time marine bacteria. *Microbial Ecology*, 1, 127–135.
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J., Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *AliiVibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *AliiVibrio logei* comb. nov., *AliiVibrio salmonicida* comb. nov. and *AliiVibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2823–2829.
- Urbanczyk, H., Ogura, Y., Hayashi, T. (2013). Taxonomic revision of Harveyi clade bacteria (family *Vibrionaceae*) based on analysis of whole genome sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2742–2751.
- Valentin, J., Tenenbaum, D., Boneck, A., Bonecker, S., Nogueira, C., Paranhos, R., Villac, M. C. (1999). Caractéristiques hydrobiologiques de la Baie de Gaunabara (Rio de Janeiro, Brésil). *Journal de Recherche Océanographique*, 24(1), 33–41.
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742–750.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Murugan, T., Chen, J. C. (2005). In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(4), 285–291.
- Verma, J., Bag, S., Saha, B., Kumar, P., Ghosh, T. S., Dayal, M., Senapati, T., Seema, M., Dey, P., Desigamani, A., Kumar, D., Rana, P., Kumar, B., Maiti, T., K., Sharma, N. C., Bhadra, R. K., Mutreja, A., Nair, G. B.,

- Ramamurthy, T., Das, B. (2019). Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(13), 6226-6231.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 25-40.
- Vezzulli, L., Baker-Austin, C., Kirschner, A., Pruzzo, C., Martinez-Urtaza, J. (2020). Global emergence of environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae* infections linked with climate change: a neglected research field? *Environmental Microbiology*, 22(10), 4342–4355.
- Vieira, R. P., Gonzalez, A. M., Cardoso, A. M., Oliveira, D. N., Albano, R. M., Clementino, M. M., Martins, O. B., Paranhos, R. (2008). Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro. *Environmental Microbiology*, 10(1), 189-199.
- Wang, X., Zhang, Y., Qin, G., Luo, W., Lin, Q. (2016). A novel pathogenic bacteria (*Vibrio fortis*) causing enteritis in cultured seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Journal of Fish Diseases*, 39(6), 765-769.
- Weinstock, M. T., Heseck, E. D., Wilson, C. M., Gibson, D. G. (2016). *Vibrio natriegens* as a fast-growing host for molecular biology. *Nature Methods*, 13(10), 849-851.
- Wetz, J. J., Blackwood, A. D., Fries, J. S., Williams, Z. F., Noble, R. T. (2014). Quantification of *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment: a multi-year analysis using QPCR. *Estuaries and Coasts*, 37(2), 421-435.
- WHO (2017a). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Disponível em: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf. Acesso em: 10/10/2020.
- WHO (2017b). One Health. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/one-health>. Acesso em: 13/04/2020.
- WHO (2020). Cholera. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cholera#tab=tab_1. Acesso em: 23/08/2020.
- Willyard, C. (2017). The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature News*, 543(7643), 15.
- Wu, J., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Hu, C., Chen, Y. (2020). Extension and application of a database for the rapid identification of *Vibrio* using MALDI-TOF MS. *Acta Oceanologica Sinica*, 39(10), 140-146.
- Xaxiri, N.-A., Nikouli, E., Berillis, P., Ar. Kormas, K. (2018). Bacterial biofilm development during experimental degradation of *Melicertus kerathurus* exoskeleton in seawater. *AIMS Microbiology*, 4, 397–412.
- Xie, J., Bu, L., Jin, S., Wang, X., Zhao, Q., Zhou, S., Xu, Y. (2020). Outbreak of Vibriosis caused by *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus* in farmed seahorse *Hippocampus kuda* in China. *Aquaculture*, 735168.
- Yamaichi, Y., Iida, T., Park, K. S., Yamamoto, K., Honda, T. (1999). Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Molecular Microbiology*, 31, 1513–1521.
- Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I., Ban, M., Aue-Umneoy, D. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. *Food Control*, 38, 30-36.
- Yen, N. T. P., Nhung, N. T., Van, N. T. B., Van Cuong, N., Chau, L. T. T., Trinh, H. N., Van Tuat, C., Tu, N. D., Lan, N. P. H., Campbell, J., Thwaites, G., Baker, S., Carrique-Mas, J. (2020). Antimicrobial residues, non-typhoidal *Salmonella*, *Vibrio* spp. and associated microbiological hazards in retail shrimps purchased in Ho Chi Minh city (Vietnam). *Food control*, 107, 106756.
- Yildiz, F. H., Visick, K. L. (2009). *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology*, 17, 109–118.
- Yu, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Liao, M., Rong, X., Li, B., Wang, K., Chen, J., Zhang, H. (2019). Complete Genome Sequence of *Photobacterium damsela* Subsp. *damsela* Strain SSPD1601 Isolated from Deep-Sea

Cage-Cultured *Sebastes schlegelii* with Septic Skin Ulcer. International Journal of Genomics, 2019, 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2019/4242653>

Zago, V., Veschetti, L., Patuzzo, C., Malerba, G., Lleo, M. M. (2020a). Resistome, Mobilome and Virulome Analysis of *Shewanella algae* and *Vibrio* spp. Strains Isolated in Italian Aquaculture Centers. Microorganisms, 8(4), 572.

Zago, V., Veschetti, L., Patuzzo, C., Malerba, G., Lleo, M. M. (2020b). *Shewanella algae* and *Vibrio* spp. strains isolated in Italian aquaculture farms are reservoirs of antibiotic resistant genes that might constitute a risk for human health. Marine Pollution Bulletin, 154, 111057.

Zdanowicz, M., Mudryk, Z. J., Perliński, P. (2020). Abundance and antibiotic resistance of *Aeromonas* isolated from the water of three carp ponds. Veterinary Research Communications, 44(1), 9-18.

Zhang, X., Lin, H., Wang, X., Austin, B. (2018). Significance of *Vibrio* species in the marine organic carbon cycle—A review. Science China Earth Sciences, 61, 1357–1368.

Zhang, Y., Lu, J., Wu, J., Wang, J., Luo, Y. (2020a). Potential risks of microplastics combined with superbugs: Enrichment of antibiotic resistant bacteria on the surface of microplastics in mariculture system. Ecotoxicology and Environmental Safety, 187, 109852.

Zhang, Z., Yu, Y. X., Wang, Y. G., Liu, X., Wang, L., Zhang, H., Liao, M., Li, B. (2020b). Complete genome analysis of a virulent *Vibrio scophthalmi* strain VSc190401 isolated from diseased marine fish half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. BMC Microbiology, 20(1), 1-13.

Zhao, S., Ma, L., Wang, Y., Fu, G., Zhou, J., Li, X., Fang, W. (2018). Antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp mariculture environment along the east coast of China. Marine Pollution Bulletin, 136, 164-170.

Zhao, S., Wei, W., Fu, G., Zhou, J., Wang, Y., Li, X., Ma, L., Fang, W. (2020). Application of biofertilizers increases fluoroquinolone resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from aquaculture environments. Marine pollution bulletin, 150, 110592.

Zheng, J., Ho, B., Mekalanos, J. J. (2011). Genetic analysis of anti-amoebae and anti-bacterial activities of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. PloS one, 6(8), e23876.

Zheng, Z., Li, R., Wong, M. H. Y., Chan, E. W. C., Xia, X., Chen, S. (2018). First detection of a blaCTX-M-15-carrying plasmid in *Vibrio alginolyticus*. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 13, 206.

Zhou, H., Liang, Y., Gao, L., Ren, J., Xue, F., Guo, D., Jiang, Y., Yang, Z., Lian, L., Dai, J. (2019). Identification and expression analyses of new genes associated with ciprofloxacin resistance in *Vibrio parahaemolyticus*. Food Research International, 125, 108629.

Zhu, X., Li, X., Shi, H., Zhou, J., Tan, Z., Yuan, M., Yao, P., Liu, X. (2018). Characterization of a novel alginate lyase from marine bacterium *Vibrio furnissii* H1. Marine Drugs, 16(1), 30.

Zimbardo, M. J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson, G. E., Johnson, J. A. (2009a). Marine Agar. In: Difco™ & BBL™ Manual Manual of Microbiological Culture Media. Becton, Dickinson and Company.

Zimbardo, M. J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson, G. E., Johnson, J. A. (2009b). TCBS Agar. In: Difco™ & BBL™ Manual Manual of Microbiological Culture Media. Becton, Dickinson and Company.

9. ANEXOS

Anexo I: Coautoria em artigo publicado na revista científica *Research in Microbiology* (<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.10.002>).

Research in Microbiology xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/resmic



Original Article

High reduction of staphylococcal biofilm by aqueous extract from marine sponge-isolated *Enterobacter* sp.

Suzanne de Oliveira Nunes ^{a,1}, Heloisa da Silva Rosa ^{a,1}, Anna Luiza Bauer Canellas ^a, Maria Teresa Villela Romanos ^a, Katia R.N. dos Santos ^a, Guilherme Muricy ^b, Walter M.R. Oelemann ^a, Marinella Silva Laport ^{a,*}

^a Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
^b Museu Nacional, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista s/no, São Cristóvão, 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Anexo II: Artigo submetido à revista científica *Environmental Pollution*.



emEditorial Manager

Role: Author Username: Anna Luiza Bauer Canellas

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • PRIVACY

Submissions Being Processed for Author Anna Luiza Bauer Canellas

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Authorship	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	ENVPOL-D-20-01634	Understanding the occurrence and trend of antimicrobial-resistant <i>Vibrio</i> spp. in an urban tropical estuary	Other Author	Sep 10, 2020	Nov 01, 2020	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

Anexo III: Artigo submetido à revista científica *Revista da Biologia*, Universidade Federal de São Paulo (USP).

Ficha de identificação
Revista da Biologia – Versão em Português

Tipo do Texto: Revisão

f. página

Área: Microbiologia

Título

Versão em Português: O gênero *Vibrio*: conceitos atuais e novas perspectivas

Versão em Inglês: The genus *Vibrio*: current concepts and new perspectives

Nomes dos autores: Anna Luiza Bauer Canellas¹, Isabelle Rodrigues Lopes¹, Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira¹, Marinella Silva Laport¹

Nomes de citação: Canellas, ALB; Lopes, IR; Oliveira, BFR; Laport, MS

Instituição: ¹Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro,

Av. Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, 21941-590. Rio de Janeiro, Brazil.

Autor correspondente: Marinella Silva Laport

Endereço de e-mail: marinella@micro.ufrj.br

Anexo IV: Coautoria em artigo submetido à revista científica Revista da Biologia, Universidade Federal de São Paulo (USP).



Ficha de identificação
Revista da Biologia – Versão em Português

Tipo do Texto: Revisão
(Artigo de Pesquisa, Método ou Revisão?)

Área: Genética e Biologia Molecular
Seção: Microbiologia

Título
Versão em Português: **Microorganismos marinhos: um reservatório de hidrolases biotecnologicamente interessantes**
Versão em Inglês: **Marine microorganisms: a reservoir of biotechnologically interesting hydrolases**

Nomes dos autores: Isabelle Rodrigues Lopes¹, Anna Luiza Bauer Canellas¹, Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira¹, Marinella Silva Laport^{*1}

Nomes de citação (ex. Darwin, C): **Lopes, IR; Canellas, ALB; de Oliveira, BFR; Laport, MS**

Instituição (nome completo das instituições, organizado hierarquicamente): ¹Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil.

Autor correspondente (apenas um): *Marinella Silva Laport

Endereço de e-mail: marinella@micro.ufrj.br

Anexo V: Coautoria em artigo publicado na revista científica *Microorganisms*.



Anexo VI: Seleção para participação como bolsista no programa *Hochschulwinterkurs* em Marburg (Alemanha), oferecido pelo Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico (DAAD).



Philipps **Universität**
Marburg

Philipps-Universität - 35032 Marburg

Anna Luiza Bauer Canellas
Tito Livio de Castro
21941-901 Rio de Janeiro
Brazil

Die Präsidentin
German Language
Winter Program (WP)
Raphael Peter
(Program Coordinator)
Zentrale: 06421 28-20
Tel.: 06421 28-25997
Fax: 06421 28-26468
E-Mail: winteruni@uni-marburg.de
Web: www.uni-marburg.de

Marburg, 16.12.2019

Letter of Acceptance

With this letter we confirm that Mrs. Anna Luiza Bauer Canellas, born 26.07.1998, has been accepted to attend the German Language Winter Program (WP) at the University of Marburg, Germany from January 3rd to February 20th, 2020.

- Arrival: January 03
- Orientation: January 04-06
- Classes start: January 07
- Duration of studies: 6 weeks

If more information is necessary, please feel free to contact us.

Sincerely,



Philipps-Universität Marburg
The President
International Office
- Special International Programs -
Deutschhausstr. 11 + 13
D-35037 Marburg
Germany

Raphael Peter (Program Coordinator)

Anexo VII: Artigo científico a ser submetido à revista científica *Environmental Microbiology Reports*, presentemente em fase final de redação e correções.

A 'One Health' approach for the identification of antimicrobial resistance reservoirs in a tropical urban estuary: diving into the unknown?

Environmental Microbiology Reports

Anna Luiza Bauer Canellas¹, Wellington Felipe Costa¹, Rodolfo Paranhos², Marinella Silva Laport^{*1}

¹Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, 21941-590. Rio de Janeiro, [Brazil](#).

²Departamento de Biologia Marinha, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Prof. Rodolfo Rocco, 211, Cidade Universitária, 21941-617. Rio de Janeiro, [Brazil](#).

Anexo VIII: Menção honrosa na XXV Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ.



Anexo IX: Participação como membro da comissão organizadora da XXV Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ.

Universidade Federal do Rio de Janeiro Instituto de Microbiologia Paulo de Góes	
Registro de Atividades Acadêmicas Optativas	
Grupo:	<input checked="" type="checkbox"/> Extensão <input type="checkbox"/> Atividades Complementares
Código do RCS:	□ □ □ □ □ □ □ □ DRE: 1 1 7 1 5 5 2 3 1
Nome do Aluno:	Anna Luiza Bauer Canellas
Ano/Período do Início:	2 0 1 7 1 Ano/Período da Conclusão: 2 0 2 0 2
Título da Atividade: XXV Semana de Microbiologia e Imunologia	
Tipo da Atividade de Extensão	Atividade Complementar
1 <input type="checkbox"/> Projeto	4 <input type="checkbox"/> Participação em Evento Científico
2 <input checked="" type="checkbox"/> Evento	5 <input type="checkbox"/> Participação em Evento Científico (Apres. de Trabalho)
3 <input type="checkbox"/> Curso	6 <input type="checkbox"/> Participação em Cursos
	7 <input type="checkbox"/> Participação em Eventos Culturais
	8 <input type="checkbox"/> Intercâmbio
	9 <input type="checkbox"/> Monitoria
Carga Horária na Atividade:	180 h
Documento Comprobatório (ANEXAR)	
<input checked="" type="checkbox"/> Declaração	Inscrito em Disciplinas? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual?
<input type="checkbox"/> Comprovante de Apresentação de Trabalho	
<input type="checkbox"/> Declaração de Coordenação de Graduação	
DOCENTE RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO	
Nome: _____ (Em Letra de Forma)	Assinatura: <u>Luiane B. de Almeida</u>

Anexo X: Apresentação de trabalhos na 10ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ.



Certificamos que o trabalho ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO VIBRIO DAS ÁGUAS DA BAIJA DA GUANABARA, RIO DE JANEIRO foi apresentado no formato PÔSTER na 10ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ.
 Autores: ANNA LUIZA BAUER CANELLAS, ISABELLE RODRIGUES LOPES, BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA e RODOLFO PARANHOS
 Orientadores: MARINELLA SILVA LAPORT.

Rio de Janeiro, 13 de Dezembro de 2019



REALIZAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
 PR-1 | Pro-Reitoria de Graduação
 PR-2 | Pro-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
 PR-5 | Pro-Reitoria de Extensão

APOIO
 TIC

A autenticidade deste certificado pode ser confirmada através do seguinte endereço: <https://certificados.sistemasiac.ufrj.br/verificar/>, digitando-se o seguinte código: 9KRZ14.



Certificamos que o trabalho ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS À ESPONJA MARINHA PLAKINA CYANOROSEA DO LITORAL DE CABO FRIO (RJ), foi apresentado no formato PÔSTER na 10ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ.
 Autores: ISABELLE RODRIGUES LOPES, ANNA LUIZA BAUER CANELLAS, BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA e GUILHERME RAMOS DA SILVA MURICY
 Orientadores: MARINELLA SILVA LAPORT.

Rio de Janeiro, 13 de Dezembro de 2019



REALIZAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
 PR-1 | Pro-Reitoria de Graduação
 PR-2 | Pro-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
 PR-5 | Pro-Reitoria de Extensão

APOIO
 TIC

A autenticidade deste certificado pode ser confirmada através do seguinte endereço: <https://certificados.sistemasiac.ufrj.br/verificar/>, digitando-se o seguinte código: 9PRZ1XV.

Anexo XI: Participação na II Feira de Inovação Biotecnológica do IMPG e FIOCRUZ e aceite para publicação do resumo acadêmico nos anais do evento.



Anexo XII: Coautoria em trabalho apresentado no congresso latino-americano de Microbiologia (2018).



Anexo XIII: Apresentação de trabalhos na 9ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ.



Certificamos que o trabalho ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO VIBRIO DAS ÁGUAS DA BAÍA DE GUANABARA, RIO DE JANEIRO, de autoria de ANNA LUIZA BAUER CANELLAS, ISABELLE RODRIGUES LOPES, BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA e WELLINGTON FELIPE DA COSTA, orientado por RODOLFO PARANHOS e MARINELLA SILVA LAPORT foi apresentado no formato PÔSTER durante a 9ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ.

Rio de Janeiro, 07 de Dezembro de 2018



A autenticidade deste certificado pode ser confirmada através do seguinte endereço: <https://certificados.sistemasiac.ufrj.br/verificar/>, digitando-se o seguinte código: 67XLX7.



Certificamos que o trabalho AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS HIDROLÍTICAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DA ESPONJA MARINHA PLAKINA SP. DO LITORAL DE CABO FRIO (RJ), de autoria de ISABELLE RODRIGUES LOPES, BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA, ANNA LUIZA BAUER CANELLAS, GUILHERME RAMOS DA SILVA MURICY e WALTER MARTIN ROLAND OELEMANN, orientado por MARINELLA SILVA LAPORT foi apresentado no formato PÔSTER durante a 9ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ.

Rio de Janeiro, 07 de Dezembro de 2018



A autenticidade deste certificado pode ser confirmada através do seguinte endereço: <https://certificados.sistemasiac.ufrj.br/verificar/>, digitando-se o seguinte código: 9KG2R3.

Anexo XIV: Autorização para uso de tabela na introdução.

Quadro 1 – Principais infecções causadas por *Vibrio* spp. As quatro principais espécies de *Vibrio* causadoras de infecções em seres humanos, suas respectivas vias de transmissão, manifestações clínicas e opções de tratamento (adaptado de Baker-Austin *et al.*, 2018; permissão para uso no anexo XIV)

The screenshot shows a web interface for RightsLink. At the top left, there are logos for Copyright Clearance Center and RightsLink. The top right navigation bar includes links for Home, Help, Email Support, and a user profile for Anna Luiza Canellas. The main content area displays the following information:

- Title:** Vibrio spp. infections
- Author:** Craig Baker-Austin et al
- Publication:** Nature Reviews Disease Primers
- Publisher:** Springer Nature
- Date:** Jul 12, 2018
- Copyright:** © 2018, Macmillan Publishers Ltd., part of Springer Nature

Below this, a green box indicates "Order Completed" with a thank you message and a note that the agreement is between Mrs. Anna Luiza Canellas and Springer Nature. It states that the confirmation email will contain the order number for future reference. The order details are as follows:

License Number	4958200148222	Printable Details
License date	Nov 29, 2020	

At the bottom, there are links for "Licensed Content" and "Order Details".

Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 8, 1 – 19.