

Associação de *Vibrio cholerae* com o zooplâncton de águas estuárias da Baía de São Marcos/São Luis – MA, Brasil

Association between *Vibrio cholerae* and zooplankton of estuaries of São Marcos Bay/São Luis – MA, Brazil

Eloisa da Graça do Rosario Gonçalves¹, Maria José Saraiva Lopes², Eurípedes Gomes de Oliveira¹ e Ernesto Hofer³

RESUMO

Foi investigado, no período de outubro de 1997 a outubro de 1998, a possível associação de *Vibrio cholerae* com o zooplâncton dos estuários dos rios Anil e Bacanga, em São Luis – MA, Brasil, a presença da forma viável, mas não cultivável de *Vibrio cholerae* O1 e a correlação entre pH, salinidade e temperatura da água com a sobrevivência da bactéria. Amostras de zooplâncton foram coletadas em dois pontos fixos em cada estuário. O método clássico de isolamento e imunofluorescência direta foram empregados na detecção da bactéria. Nas 52 amostras obtidas de zooplâncton houve predomínio de Copepodes. O cultivo permitiu a obtenção de 55 isolados de *Vibrio cholerae* não O1. Os sorogrupos O1 e O139 foram demonstrados, respectivamente em 37 (71,1%) e 17 (32,7%) na imunofluorescência. Formas viáveis, mas não cultiváveis de *Vibrio cholerae* O1 foram detectadas em 70,8% das amostras estudadas. Correlação significativa foi constatada entre salinidade e pH da água e isolamento de *Vibrio cholerae*.

Palavras-chaves: *Vibrio cholerae*. Ecologia. Zooplâncton. Baía de São Marcos.

ABSTRACT

This study was carried from October 1997 to October 1998 with the purpose of investigating the link between the species *Vibrio cholerae* and zooplankton in the estuaries of rivers Anil and Bacanga in São Luis, Maranhão. Research of viable but non culturable forms of *Vibrio cholerae* O1, and analyze the correlation between pH values, salinity and water temperature with the presence of bacteria in zooplankton samples. The traditional method of cultivation and fluorescent antibody technique were applied to detect the bacteria. A total of 52 samples of zooplankton were collected. There was a predominance of Copepoda. The culture enabled 55 isolates of *Vibrio cholerae* non-O1. The serogroups O1 and O139 were identified in 37 (71.1%) and 17 (32.7%) samples respectively by the fluorescence. Viable but non culturable forms of *Vibrio cholerae* were detected in 70.8% of the samples studied. A significant correlation was established between salinity and the water's pH value and *Vibrio cholerae*.

Key-words: *Vibrio cholerae*. Ecology. Zooplankton. São Marcos Bay.

O padrão epidemiológico da cólera tem passado por mudanças significativas nas últimas décadas em decorrência do processo de endemização, em que exacerbações da doença são intercaladas por períodos silenciosos, seguindo um padrão sazonal²⁵. Vários mecanismos foram propostos para explicar a sobrevivência do bacilo nos períodos interepidêmicos, sendo as

evidências epidemiológicas e laboratoriais mais consistentes com a existência de reservatórios ambientais. Esta hipótese fora defendida por Robert Koch, em 1884, após isolar o vibrião de água de um tanque em Calcutá²⁰. Minuciosos trabalhos de revisão registram estudos em vários países nas primeiras décadas do século XX, demonstrando a presença do *Vibrio* em diferentes ambientes aquáticos^{9 19 29}.

1. Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA. 2. Departamento de Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA. 3. Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Apoio financeiro: CAPES

Endereço para correspondência: Dra. Eloisa da Graça do Rosario Gonçalves. Deptº de Patologia/UFMA. Praça Madre Deus 2, Térreo, Bairro Madre Deus, 65025-560 São Luis, MA.

Tel: 55 98 221-0270

e-mail: regionalsbmt@elo.com.br

Recebido para publicação em 16/10/2003

Aceito em 19/05/2004

No Brasil, foram isolados *Vibrio cholerae* O1 e não-O1 em afluentes de estações de tratamento de esgotos, na década de 70 e início dos anos 80^{14 23}. Peixes, ostras, camarões e caranguejos constituem fontes de infecção, sendo identificados como causa de epidemias ou casos isolados de cólera nos Estados Unidos, Itália, Portugal e Austrália, entre outros países⁹. Estudos revelam, ainda, a associação de *V. cholerae* O1 com plantas aquáticas e fitoplâncton^{17 18}.

Copépodes marinhos albergam uma flora bacteriana composta por membros da família Vibrionaceae³², o que foi confirmado por microscopia eletrônica¹⁵. A interação com o zooplâncton parece ser decisiva na sobrevivência ambiental do *V. cholerae*, conforme tem sido observado em microecossistemas experimentais^{2 15 16}.

Fatores ambientais, destacando-se pH, temperatura, salinidade e concentração de nutrientes exercem importante influência nessa interação, sendo o *V. cholerae* mais ativo em condições que se aproximam das características naturais dos estuários^{16 24 28 31}. Nessas condições, contudo, o cultivo de *V. cholerae* O1 pelo método classicamente utilizado, ao contrário de *V. cholerae* não O1, é bastante difícil nos períodos interepidêmicos.

O emprego da imunofluorescência indireta para a demonstração da bactéria em amostras de água e, posteriormente, a associação com a contagem direta de células viáveis, permitiram a detecção de formas viáveis, mas não cultiváveis do vibrião colérico em ambientes aquáticos^{8 33}. Anticorpos monoclonais contra a fração "A" do antígeno somático do *V. cholerae* O1, assim como contra o determinante antigênico do lipopolissacarídeo do sorogrupo O139, aliados à técnica direta de coloração, elevaram a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo do método a 100%, quando testado no campo^{11 12}.

O Estado do Maranhão foi atingido pela epidemia de cólera que ocorreu no continente sulamericano a partir de 1991, havendo registro da doença na capital, São Luis, de 1992 a 1995. O município localiza-se às margens da Baía de São Marcos, onde daságuam as várias bacias hidrográficas do estado¹⁰. Com nascente no interior da Ilha de São Luis, destacam-se os rios Bacanga e Anil (extensão de 9.500m e 13.800m, respectivamente), os quais percorrem áreas urbanas e com os quais as populações ribeirinhas mantêm estreita relação. O desenvolvimento deste trabalho levou em conta estes dados, tendo o objetivo de investigar a presença de *V. cholerae* em associação com a rica fauna zooplânctônica da região.

MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo compreende os estuários dos rios Anil e Bacanga que percorrem a Ilha de São Luis e deságuam na Baía de São Marcos, tendo sido definidas 2 estações de amostragem (1 e 2), em cada estuário. O estuário do rio Anil recebe influência direta de águas marinhas costeiras, enquanto o estuário do rio Bacanga encontra-se limitado, em parte, por uma barragem artificial e por comportas que são abertas a intervalos trimestrais. As coletas de zooplâncton foram feitas em intervalos mensais, de outubro de 1997 a outubro de 1998, empregando-se rede de plâncton, confeccionada com malha de 65mm de abertura, em

arrastos horizontais, subsuperficiais, durante 5 minutos. O material foi dividido em 2 partes: uma para o estudo bacteriológico, mantido em frascos estéreis, à temperatura ambiente; outra, em frascos contendo solução de formaldeído a 4%, neutralizado com borato de sódio, destinada à identificação do zooplâncton. Medidas de pH, temperatura e salinidade da água foram tomadas *in loco*, utilizando-se salinômetro/termômetro Beckman e pHmeter Hanna HI 9025C.

A identificação dos organismos zooplânctônicos foi feita seguindo critérios morfológicos clássicos estabelecidos^{3 4 5 30}.

O material destinado ao cultivo bacteriano foi centrifugado a 3.000rpm, durante 10 minutos, sendo feitas lavagens do sedimento por 3 vezes com água destilada. Tanto o sedimento final, quanto o sobrenadante foram semeados em 10ml de água peptonada contendo 1% de NaCl. Após incubação a 37°C por 6 horas, o crescimento foi semeado em Agar-TCBS. De 3 a 5 colônias (sacarose positivas e negativas) foram submetidas a estudo bioquímico. Todas as amostras não halofílicas, compatíveis bioquimicamente com a espécie *V. cholerae* foram submetidas à soroglutinação, empregando-se antígenos somáticos dos sorogrupos O1 e O139 e dos sorotipos Inaba e Ogawa, produzidos no Laboratório Nacional de Referência de Cólera, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Para a realização da imunofluorescência direta foram empregados anticorpos monoclonais contra os sorogrupos O1 e O139 (New Horizons Diagnostics Corp. Columbia, MD), marcados com fluoresceína, sob forma liofilizada e reconstituída com 1ml de água destilada antes do uso. Amostras de zooplâncton conservadas em formalina foram centrifugadas, confeccionado-se esfregaços com o sedimento, em lâminas de vidro com poços circulares. Controles positivos e negativos foram incluídos em todos os testes. Cada poço foi coberto com 10ml do anticorpo, sendo as lâminas incubadas em câmara úmida, à temperatura de 37°C, durante 30 minutos e, em seguida, lavadas com salina tamponada, em dois ciclos de 10 minutos. A leitura foi feita em microscópio de fluorescência, com comprimento de onda BP 450-490nm e lâmpada HBO 50, em aumento de 400 vezes.

Vinte e quatro amostras de zooplâncton recém coletadas e não fixadas com formalina, recolhidas no período de maio a outubro de 1998 foram utilizadas para a pesquisa das formas viáveis, mas não cultiváveis, conforme técnica descrita por Brayton e cols⁶.

RESULTADOS

Foram obtidas 52 amostras de zooplâncton, identificando-se grande variedade de organismos. A distribuição nos diferentes meses de coleta revela o predomínio de Copepoda (concentração superior a 50% em relação aos outros grupos) em 98,1% das amostras provenientes do Rio Anil e em 86,5% das amostras do Rio Bacanga. As Figuras 1 e 2 mostram a variedade de organismos identificados nos estuários.

Não houve isolamento de *V. cholerae* O1 e O139 no cultivo em TCBS. O método permitiu, no entanto, a obtenção de 55 isolados de *V. cholerae* não O1 a partir de 14 amostras coletadas de dezembro de 1997 a setembro de 1998. Foram identificados os tipos bioquímicos I, II e III de Heiberg¹³, havendo predomínio do tipo II (Tabela 1).

HOLOPLÂNCTON	
Copepoda (Calanoida)	
<i>Eucalanus pileatus</i> Giesbrecht, 1888	
<i>Acartia liljeborgi</i> Giesbrecht, 1892	
<i>Centropages velificatus</i> Dana, 1849	
<i>Centropages brachiatus</i> Dana, 1849	
<i>Labidocera fluviatilis</i> E. Dahl, 1894	
<i>Paracalanus crassirostris</i> E. Dahl, 1894	
<i>Paracalanus aculeatus</i> Giesbrecht, 1888	
<i>Pseudodiaptomus acutus</i> E. Dahl, 1894	
<i>Temora turbinata</i> Wright, 1836	
<i>Temora stylifera</i> Dana, 1848	
<i>Pontelopsis vilosae</i> Brady, 1883	
<i>Pontelopsis sp</i>	
<i>Eucalanus sewelli</i> Dana, 1849	
<i>Calanopia americana</i> E. Dahl, 1894	
<i>Pontelina plumata</i> L. Oliveira, 1947	
<i>Clausocalanus furcatus</i> Brady, 1883	
Copepoda (Cyclopoida)	
<i>Oithona hebes</i> Giesbrecht, 1891	
<i>Oithona oswaldocruzi</i> L. Oliveira, 1947	
<i>Oithona nana</i> Giesbrecht, 1892	
<i>Oithona simplex</i> Claus, 1863	
<i>Hemicyclops thalassius</i> Vervoort y Ramires, 1966	
<i>Mesocyclops sp</i>	
<i>Cyclops sp</i>	
<i>Termocyclops sp</i>	
<i>Apocyclops panamensis</i> Marsh, 1982	
<i>Corycaeus giesbrechti</i> E. Dahl, 1894	
<i>Oncaea media</i> Giesbrecht, 1891	
<i>Oncaea sp</i>	
Copepoda Harpaticoida	
<i>Euterpina acutifrons</i> Dana, 1892	
<i>Atheylla sp</i>	
<i>Ergasilus sp</i>	
<i>Harpaticoides sp</i>	
Tintinnida	
<i>Favella ehrenbergi</i> Claparide y Lichman Jorgensen, 1924	
<i>Tintinnopsis sp</i>	
Decapoda	
<i>Lucifer faxoni</i> Borradaile, 1915	
Ostrocoada	
Hydromedusae	
Rotifera	
<i>Brachionus plicatilis</i> O F Muller, 1786	
Nematoda	
Isopoda	
Amphipoda	
Chaetognatha	
<i>Sagitta sp</i>	
<i>Sagitta inflata</i>	
Appendicularia	
<i>Oikopleura dioica</i>	
MEROPLANCTON	
Gastropoda (larva)	
Bivalvia (veliger)	
Polychaeta (trocofora)	
Brachyura (zocas)	
Cirripedia (cypris e nauplii)	
Copepoda (nauplii)	
Porcelanidae (larva)	
Pennacidae (larva)	
Echinodermata (larva)	
Insecta (larva)	
Pisces (ovos)	

Figura 1 - Zooplâncton encontrado no estuário do Rio Anil / São Luis - MA (outubro de 1997 a outubro de 1998)

HOLOPLÂNCTON	
Copepoda (Calanoida)	
<i>Eucalanus pileatus</i> Giesbrecht, 1888	
<i>Acartia liljeborgi</i> Giesbrecht, 1892	
<i>Centropages velificatus</i> Dana, 1849	
<i>Eucalanus pileatus</i> Giesbrecht, 1882	
<i>Paracalanus crassirostris</i> E. Dahl, 1894	
<i>Pseudodiaptomus acutus</i> E. Dahl, 1894	
<i>Temora stylifera</i> Dana, 1848	
<i>Eucalanus sewelli</i> Dana, 1849	
Copepoda (Cyclopoida)	
<i>Oithona hebes</i> Giesbrecht, 1891	
<i>Oithona oswaldocruzi</i> L. Oliveira, 1947	
<i>Hemicyclops thalassius</i>	
Vervoort y Ramires, 1966	
<i>Caligus elongatus</i> Nordman, 1943	
<i>Hemicyclops thalassius</i>	
Vervoort y Ramires, 1966	
<i>Mesocyclops sp</i>	
<i>Cyclops sp</i>	
<i>Eucyclops sp</i>	
<i>Apocyclops panamensis</i> Marsh, 1982	
Copepoda Harpaticoida	
<i>Euterpina acutifrons</i> Dana, 1892	
<i>Atheylla sp</i>	
<i>Ergasilus sp</i>	
<i>Harpaticoides sp</i>	
Rotifera	
<i>Brachionus plicatilis</i> O F Muller, 1786	
<i>Brachionus angularis</i> Gosse, 1851	
<i>Brachionus rubens</i> Ehrenberg, 1838	
<i>Brachionus quadridentatus</i> Hermann, 1766	
<i>Brachionus calciflorus</i> Pallas, 1766	
<i>Ascomorpha sp</i>	
<i>Asplarichna sp</i>	
Tintinnida	
<i>Favella ehrenbergi</i> Claparide y Lichman Jorgensen, 1924	
<i>Tintinnopsis sp</i>	
<i>Amphorelopsis sp</i>	
<i>Condonellopsis sp</i>	
Cladocera	
<i>Diaphanosoma brachyurum</i> Lievin, 1848	
<i>Bosmonopsis deitersa</i> Richardi, 1895	
<i>Alona sp</i>	
Chaetognatha	
<i>Sagitta sp</i>	
Appendicularia	
<i>Oikopleura sp</i>	
Hydromedusae	
Nematoda	
Isopoda	
Amphipoda	
Ostrocoada	
MEROPLANCTON	
Gastropoda (larva)	
Bivalvia (veliger)	
Polychaeta (trocofora)	
Brachyura (zocas)	
Cirripedia (cypris e nauplii)	
Copepoda (nauplii)	
Porcelanidae (larva)	
Pisces (ovos e larvas)	

Figura 2 - Zooplâncton encontrado no estuário do Rio Bacanga / São Luis - MA (outubro de 1997 a outubro de 1998)

Tabela 1 - Distribuição de *Vibrio cholerae* em associação com o zooplâncton dos estuários dos rios Anil e Bacanga - São Luis / MA (outubro de 1997 a outubro de 1998).

Ano/mês	<i>Vibrio cholerae</i> não O1/não O139				<i>Vibrio cholerae</i> O1**				<i>Vibrio cholerae</i> O139**			
	Bacanga		Anil		Bacanga		Anil		Bacanga		Anil	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1997												
out	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
nov	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dez	1 (II)	-	-	4 (I; III)	+	+	-	-	+	+	-	-
1998												
jan	5 (II)	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
fev	3 (I; II)	2 (II)	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
mar	5 (II)	6 (I; II)	-	3 (II)	+	-	+	+	-	-	-	-
abr	8 (I; II)	11 (I; II)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
mai	2 (I; II)	1 (II)	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
jun	-	2 (I; II)	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
jul	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
ago	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
set	2 (I;II)	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
out	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11 número de isolados em cada amostra; I; II; III grupos bioquímicos de Heiberg; + presença da bactéria; - ausência da bactéria; * processo clássico de isolamento; ** imunofluorescência direta

Vibrio cholerae O1 foi demonstrado, pela imunofluorescência direta, em 37 (71,1%) amostras de zooplâncton, enquanto o *V. cholerae* O139, em 17 (32,7%). Em 12 amostras foram evidenciados os dois sorogrupos (Tabela 1).

Formas viáveis, mas não cultiváveis estavam presentes em 17 (70,8%) das 24 amostras estudadas. No material corado havia tanto organismos inteiros quanto fragmentos, tendo-se constatado a associação bacteriana com os dois tipos de estrutura (Figura 3).

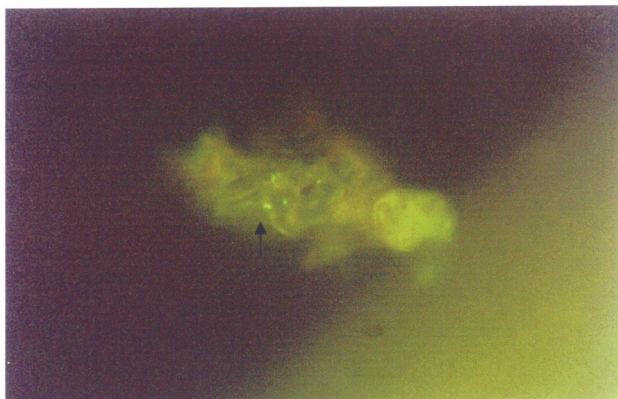


Figura 3 - Imunofluorescência direta: *Vibrio cholerae* O₁ em associação com organismo zooplanctônico.

A salinidade da água manteve média de 24,5 partes por mil na estação 1 e de 22,4 partes por mil na estação 2 do rio Bacanga. O nível mais elevado foi registrado nos meses de dezembro de 1997 e janeiro de 1998. A partir de fevereiro, houve redução chegando a 11,5 e 12,7 partes/mil, no mês de abril, nas estações 1 e 2, respectivamente.

No rio Anil os níveis mantiveram-se acima de 30 partes por mil, exceto nos meses de setembro e outubro de 1998, quando foram registrados os valores de 23,2 e 29,7.

A temperatura da água manteve-se entre 28,1 e 31,3°C no estuário do Rio Bacanga e entre 27,2 e 29,8°C, no Rio Anil. Em ambas as áreas notou-se elevação de 2 graus durante o período chuvoso.

Com relação ao pH, houve variação de 6,5 a 9,8 no estuário do rio Bacanga e de 6,2 a 9,0 no estuário do rio Anil. Níveis superiores a 9,0 foram registrados nos meses de maio, junho e julho nas duas estações de amostragem do Rio Bacanga, enquanto no rio Anil verificou-se pH de 9,0 no mês de julho, em ambas as estações.

Coefficiente de correlação linear (r) foi calculado entre variações dos fatores ambientais abióticos e número de amostras positivas para *V. cholerae* (Tabela 2). Não foi possível o cálculo do coeficiente em relação ao *V. cholerae* não O1, isolado das amostras do rio Anil, uma vez que apenas duas amostras foram

positivas, enquanto todas as amostras do sorogrupo O139 foram coletadas na mesma faixa de temperatura.

DISCUSSÃO

O estudo da interação de *V. cholerae* com zooplâncton apresenta dificuldades específicas quando realizado *in situ*, em decorrência da multiplicidade de fatores envolvidos no fenômeno e das freqüentes mudanças das condições ambientais em estuários. No presente estudo, duas situações distintas podem ser identificadas, levando-se em conta que os sorogrupos não O1 foram estudados no estado cultivável, enquanto os sorogrupos O1 e O139, no estado viável, mas não cultivável, características fisiológicas essencialmente distintas, sendo o estado não cultivável considerado forma de resistência, capaz de sobreviver em condições ambientais adversas por períodos prolongados⁷.

O conjunto do zooplâncton coletado demonstra a grande diversidade de grupos, compatível com a riqueza e dinâmica próprias do ambiente estuarino. A determinação do percentual de cada grupo dentro da comunidade zooplanctônica demonstrou clara predominância da classe Copepoda em 98,1% das amostras coletadas no estuário do Rio Anil e em 86,5% das amostras do Rio Bacanga, dados semelhantes aos encontrados anteriormente nos mesmos ambientes²¹.

Houve maior variedade de espécies entre os copépodes no Rio Anil, observando-se a presença de quetognatos em moderada concentração no período de janeiro a junho de 1998. No Rio Bacanga chamou a atenção a maior variedade de Rotifera e a presença de Cladocera, grupos que são mais bem adaptados a ambientes aquáticos com baixa salinidade²⁷. Registramos que as águas do Rio Bacanga são represadas por uma barragem, sofrendo menor influência das marés, o que poderia estar influenciando o padrão de distribuição zooplanctônica nesse estuário.

A ausência de detecção do sorogrupo O1 de *V. cholerae* pelo método clássico de cultivo está de acordo com outros pesquisadores^{7 15 23}. A hipótese de que a concentração de bactérias diminui no ambiente a ponto de não permitir o crescimento nos meios de cultura parece não se justificar, a partir da constatação de formas viáveis, mas não cultiváveis em associação com a flora e fauna aquáticas^{8 15}. Estudos demonstram que cada copépode pode ser colonizado por até 10⁴ bactérias, o que seria suficiente para produzir infecção em pessoas com acloridria. Durante o *bloom* de zooplâncton a proliferação de bactérias se acentua, tornando este risco ainda maior⁷.

Os meios de enriquecimento e seletivos rotineiramente empregados no estudo de amostras ambientais foram desenvolvidos para material clínico, de modo que as alterações metabólicas

Tabela 2 - Coeficientes de correlação linear (r) entre variação de pH, salinidade e temperatura e número de amostras positivas para *V. cholerae* - São Luis/MA (outubro de 1997 a outubro de 1998).

Parâmetro ambiental	<i>Vibrio cholerae</i> não O1 / não O139*		<i>Vibrio cholerae</i> O1**		<i>Vibrio cholerae</i> O139**	
	Bacanga	Anil	Bacanga	Anil	Bacanga	Anil
pH	0,63	-	0,67	0,98	-0,89	-0,87
Salinidade	-0,89	-	0,52	0,54	0,33	-0,24
Temperatura	0,001	-	0,001	0,001	0,001	-

- coeficiente não calculado; * processo clássico de isolamento; ** imunofluorescência direta

exibidas pelas formas não cultiváveis poderiam interferir na capacidade de multiplicação e crescimento bacteriano nos meios disponíveis¹⁵.

A imunofluorescência direta revelou *V. cholerae* O1 em 37 (71,1%) das 52 amostras de zooplâncton, o que, aliado ao encontro das formas viáveis, mas não cultiváveis, demonstra a sobrevivência do vibrião nos estuários dos rios Anil e Bacanga. No material corado havia tanto organismos inteiros, como fragmentos, tendo sido observado a associação da bactéria, na forma viável, mas não cultivável, com os dois tipos de estrutura. A observação das lâminas não permitiu identificar qual grupo estava especificamente envolvido na associação. No entanto, a constatação do predomínio da classe Copepoda em 98,1% das amostras do rio Anil e em 86,5%, do rio Bacanga, indica forte possibilidade da associação com estes grupos de organismos.

O reconhecimento do fenômeno ganha maior importância ao se considerar a manutenção do potencial infeccioso da bactéria nessa condição, conforme demonstrado em trabalho experimental⁷. A adesão direta de *V. cholerae* a superfícies contendo quitina favoreceria a produção de cólera, uma vez que nessa situação a bactéria está mais protegida dos efeitos do pH ácido²⁶.

Ressalta-se, ainda, o encontro de *V. cholerae* O139 em 32,7% das amostras, uma vez que o surgimento deste patógeno, em 1992, despertou a necessidade de vigilância epidemiológica em relação ao seu possível envolvimento da gênese de doença diarreica semelhante à cólera clássica¹.

A análise dos fatores ambientais bióticos e abióticos permitiu identificar flutuação sazonal, traduzida pela presença de organismos da classe Rotifera, pela acentuação do pH e da temperatura e pela diminuição da salinidade no estuário do rio Bacanga durante a estação chuvosa. No rio Anil este comportamento foi observado de forma menos definida, pela presença de quetognatos em concentração moderada na estação 2 e pelas elevações de pH e temperatura registradas no período chuvoso, mantendo-se a salinidade em valores elevados. A comparação deste último parâmetro entre os dois estuários mostra níveis mais baixos no rio Bacanga em todos os meses, o que pode ser explicado pela presença de uma Barragem, cujas comportas são abertas a intervalos trimestrais.

A distribuição das 14 amostras de zooplâncton das quais foram obtidos os isolados de *V. cholerae* não O1 mostrou que 12 (85,7%) foram oriundas do estuário do rio Bacanga. Destas, 10 foram coletadas no período das chuvas, coincidindo com as variações dos fatores ambientais e da composição zooplancônica, o que caracteriza o padrão sazonal de distribuição de *V. cholerae* neste estuário.

A salinidade parece ter exercido a maior influência no isolamento bacteriano, considerando-se a acentuada diminuição de seus níveis no mesmo período de obtenção das amostras positivas. O coeficiente de correlação de - 0,89 indica que à medida que os níveis de salinidade diminuíram, maior número de amostras positivas foram detectadas. Esta observação foi reforçada pela obtenção de isolados bacterianos a partir de apenas duas amostras de zooplâncton dentre as 26 provenientes do estuário do rio Anil, onde a salinidade manteve-se (exceto por dois meses) acima de 30 partes por mil.

O coeficiente de correlação de 0,63 observado em relação ao pH mostrou que a alcalinidade do meio também favoreceu o isolamento

bacteriano, embora esta correlação seja menos intensa. Já as discretas variações da temperatura da água não exerceram influência na presença da bactéria ($r=0,001$).

Flutuação sazonal definida não foi observada em relação ao sorogrupo O1 que foi demonstrado pela imunofluorescência direta em associação com o zooplâncton em, pelo menos, uma estação de amostragem durante todo o período de estudo. Este padrão se repetiu com o sorogrupo O139, cuja distribuição, embora não tenha sido tão uniforme quanto o *V. cholerae* O1, também não se relacionou às condições climáticas. A análise dos fatores ambientais demonstra correlação positiva moderada no rio Bacanga ($r=0,67$) e muito acentuada no rio Anil ($r=0,98$) entre variações de pH e encontro do vibrião nas amostras de zooplâncton. Os coeficientes de correlação entre variações da salinidade mostraram pouca influência deste fator na associação do sorogrupo O1 e zooplâncton. Da mesma forma, não houve correlação significativa entre detecção de *V. cholerae* O1 e temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albert MJ. Personal reflections on discovery of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal: a tribute to team work and international collaboration. *Journal of Diarrhoeal Disease Research* 11: 207-210, 1993.
2. Araújo DB, Martins SCS, Albuquerque LMB, Hofer E. Influence of copepod *Mesocyclops longisetus* (Crustacea Cyclopidae) on the survival of *Vibrio cholerae* O1 in fresh water. *Cadernos de Saúde Pública* 12: 551-554, 1996.
3. Bjornberg TKS. On marine free-living copepods of Brazil. *Boletim do Instituto de Oceanografia (USP)* 13: 3-142, 1963.
4. Boltovskoy D. ed. Atlas del zooplancton del Atlantico Sudoccidental e metodos de trabajo com el zooplancton marino. Mar del Plata. Instituto Nacional Investigación y Desarrollo Pesquero, 1981.
5. Brandorff GO, Koste W, Smirnov NN. The composition and structure of Rotiferan and Crustacean communities of the Lower Rio Nhamundá, Amazonas, Brazil. *Studies of Neotropical Fauna and Environment* 17: 69-121, 1982.
6. Brayton PR, Colwell RR. Fluorescent antibody staining method for enumeration of viable environmental *Vibrio cholerae* O1. *Journal of Microbiological Methods* 6: 309-314, 1987.
7. Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 274: 2025-2031, 1996.
8. Colwell RR, Brayton, PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq AS, Palmer LM. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnology* 3: 817-820, 1985.
9. Feachem RG. Environmental aspects of cholera epidemiology – I. A review of selected reports of endemics and epidemic situations during 1961-1980. *Tropical Disease Bulletin* 78: 675-698, 1981.
10. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Atlas do Estado do Maranhão. Rio de Janeiro, 1984.
11. Hasan JAK, Berstein D, Huq A, Loomis L, Tamplin ML, Colwell RR. Cholera DFA: an improved direct fluorescent monoclonal antibody staining kit for rapid detection and enumeration of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiology Letters* 120: 143-148, 1994.
12. Hasan JAK, Huq A, Nair B, Garg S, Mukhopadhyay AK, Loomis L, Berstein D, Colwell RR. Development and testing of monoclonal antibody based rapid immunodiagnostic test kits direct detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2935-2939, 1995.
13. Heiberg B. The biochemical reactions of vibrios. *Journal of Hygiene* 36: 114-117, 1936.

14. Hofer E, Hernandez D. Incidência de *Vibrio cholerae* não O1 em afluentes de estações de tratamento de esgotos da cidade do Rio de Janeiro. *Revista de Microbiologia* 21: 31-40, 1990.
15. Huq A, Small EB, West PA, Huq MI, Rahman R, Colwell RR. Ecological relationship between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 275-283, 1983.
16. Huq A, West P, Small EB, Huq MI, Colwell RR. Influence of water temperature, salinity and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 420-424, 1984.
17. Islam MS, Drasar BS, Bradley DJ. Attachment of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to various freshwater plants and survival with a filamentous green alga, *Rhizoclonium fontanum*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 92: 396-401, 1989.
18. Islam MS, Drasar BS, Bradley DJ. Long-term persistence of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the mucilaginous sheath of a blue-green alga *Anabaena variabilis*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 133-139, 1990.
19. Islam MS, Drasar BS, Sack B. The aquatic environment as a reservoir of *Vibrio cholerae*: a review. *Journal of Diarrhoeal Disease Research* 11: 197-206, 1993.
20. Koch R. An address on cholera and its bacillus. *British Medical Journal* 2: 403-407, 1884.
21. Lopes MJS. Zooplâncton do estuário do rio Anil. São Luis – MA. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia (Universidade Federal do Maranhão)* 4: 77-96, 1982.
22. Martins MT, Pessoa GVA, Sanchez PS, Sato MIZ, Coimbra CA, Monteiro CK, Marques E. Occurrence of *V. cholerae* O1 non toxigenic in wastewater from São Paulo, Brazil. *Water Science and Technology* 24: 363-366, 1991.
23. Martins MT, Sanchez PS, Sato MIZ, Brayton PR, Colwell RR. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment in Brazil employing direct immunofluorescence microscopy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 390-392, 1993.
24. Miller CJ, Drasar BS, Feachem RG. Response of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to physico-chemical stresses in aquatic environment. *Journal of Hygiene* 93: 475-496, 1984.
25. Miller CJ, Feachem RG, Drasar BS. Cholera epidemiology in developed and developing countries: new thoughts on transmission, seasonality and control. *Lancet* 2: 261-263, 1985.
26. Nalim DR, Daya V, Reid A, Levine MM, Cisneros L. Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. *Infection and Immunity* 25: 768-770, 1979.
27. Oliver SR. Los Cladoceros Argentinos. *Revista del Museo de la Plata. Sección zoología* 7: 173-269, 1962.
28. Patel M, Isaacson M, Gouws, E. effect of iron and pH on the survival of *Vibrio cholerae* in water. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89: 175-177, 1995.
29. Pollitzer R. Cholera. Monograph 43. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1959.
30. Reid JW. Chave de identificação e lista de referências bibliográficas para espécies continentais sulamericanas de vida livre da Ordem Cyclopoida (Crustacea, Copepoda). *Boletim de Zoologia (Universidade de São Paulo)* 9: 17-143, 1985.
31. Singleton FL, Attwel RW, Jangi MS, Colwell RR. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 1047-1058, 1982.
32. Sochard MR, Wilson DF, Austin B, Colwell RR. Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods. *Applied and Environmental Microbiology* 37: 750-759, 1979.
33. Xu HS, Roberts NC, Adams LB, West PA, Siebeling RJ, Huq A, Huq MI, Rahman R, Colwell RR. An indirect fluorescent antibody staining procedure for detection of *Vibrio cholerae* serovar O1 cells in aquatic environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 2: 221-231, 1984.