



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

IGOR CAVALCANTE DINIZ DANTAS

PRESENÇA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Enterococcus* EM
GALERIAS PLUVIAIS DE FORTALEZA

FORTALEZA

2022

IGOR CAVALCANTE DINIZ DANTAS

PRESENÇA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Enterococcus* EM
GALERIAS PLUVIAIS DE FORTALEZA

Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D212p Dantas, Igor Cavalcante Diniz.
Presença de bactérias do gênero *Enterococcus* em galerias pluviais de Fortaleza / Igor Cavalcante Diniz Dantas. – 2022.
49 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.
1. Águas costeiras. 2. Enterobactérias. 3. Virulência. 4. Resistencia a antibióticos. I. Título.
CDD 639.2
-

IGOR CAVALCANTE DINIZ DANTAS

PRESENÇA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Enterococcus* EM
GALERIAS PLUVIAIS DE FORTALEZA

Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Aprovada em: 14/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Marina Teresa Torres Rodriguez
Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Funcap

Profa. Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Ana Mira e Luciano Dantas, a
minha avó, irmão e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da vida, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar e perseverar durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Ana Mira e Luciano Dantas, minha avó, Maria Creuza, pelo carinho, pela paciência, por todo amor e cuidado, pelo suporte financeiro durante a graduação, sem vocês não teria sido possível concluir essa fase da minha vida.

Ao meu irmão, Iago Diniz.

A Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes por ter sido minha orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação e amizade durante os anos em que me orientou, me proporcionou meu norte no curso.

A Dra. Marina Teresa Torres Rodríguez pela paciência e disponibilidade, de instruir, tirar dúvidas e questionamentos nos processos de bancada, meu muito obrigado.

A Prof.a Dra. Oscarina Viana de Sousa e Dra. Fátima Cristiane Teles, pela paciência de me ensinar e aconselhar, enaltecendo o correto e o errado, pelo convívio por fazer parte do Laboratório de Microbiologia, pela amizade, competência e por todo carinho que recebi nesses anos.

Aos professores participantes da banca examinadora, Dr. Aldeney Andrade Soares Filho e Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza, pelas atenciosas sugestões e colaborações.

Aos meus amigos de bancada, Ana Vládila da Silva Oliveira, Anna Luisa de Carvalho Brito, Lucas Daniel Borges Lopes, pela paciência, disponibilidade, instruções e companhia durante esse projeto.

Ao Dr. Rafael Rocha, pelo auxílio nas técnicas de biologia molecular e ao Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM) pelo espaço cedido para realização do experimento.

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e de Pescados (LAMAP), e a todos seus membros, com quem convivi intensamente durante os últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como formando, meu muito obrigado.

Aos meus amigos de laboratório Maria Ariele Cunha, Ana Vládila, Anna Brito, Alexandra Sampaio, Larissa Nunes, Raquel Cavalcante, Yasmin Girão, Daniel Borges, Jhones Vieira, Marcio Ivis, Thereza Martins, Eduarda Torres, Matheus Dantas, Letícia Mota, Isabela Tavares e Paulo Miguel, todos merecem um bolo.

A Fabíola de Lima Araújo, por estar nessa caminhada de curso e vida junto comigo.

Aos meus colegas de turma, por compartilharem comigo tantos momentos de descobertas e aprendizado e por todo o companheirismo ao longo deste percurso.

Ao departamento de Engenharia de Pesca e todos os seus funcionários.

Ao Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da Universidade Federal do Ceará e seus funcionários.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho, meus agradecimentos do fundo do coração!

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado.” (J.R.R. Tolkien)

RESUMO

O crescimento da população nas cidades ao redor do mundo gera altas demandas sobre os recursos naturais existentes, sem contar as pressões ambientais que são geradas e, eventualmente, afetam a qualidade de vida desses moradores. É importante ter em mente que essa demanda da população, na maioria das vezes, agrava problemas como saúde, emprego e saneamento básico. O descarte de resíduos por águas pluviais e despejos de esgotos alcançam rios e mares, contaminando os recursos hídricos, essenciais para a existência de todos os organismos vivos. Neste contexto, essa pesquisa teve como objetivo principal estudar bactérias do gênero *Enterococcus*, indicadores de contaminação por esgotos, em águas de uma galeria pluvial e do riacho Maceió na orla de Fortaleza. Adicionalmente, foram detectados fatores de virulência e estabelecidos perfis de resistência a antibióticos entre esses isolados bacterianos. Foram realizadas cinco coletas contínuas de amostras de água em dois pontos da orla contribuidores de descartes urbanos: uma galeria em frente à praia do Meireles (G1) e no deságue do Riacho Maceió (G2). Foram detectados níveis de *Enterococcus*/100 mL acima do limite estabelecido pela legislação vigente em 100% das amostras. A partir das colônias crescidas sobre o meio de cultura seletivo foram isoladas 100 cepas, identificadas 74 dessas como pertencentes ao gênero *Enterococcus*; entre elas, 36 (48,65%) produziram exopolissacarídeo (EPS) e 20 (27,01%) foram capazes de aderir à placa de poliestireno. A frequência de isolados de *Enterococcus* spp. apresentando fatores de virulência foi de 54 (72,97%) para o teste de gelatinase, 36 (48,64%) para o teste de caseinase, 7 (9,45%) para o teste de fosfolipase; e no teste de hemolisina, 18 isolados (24,32%) apresentaram β-hemólise. Os maiores índices de resistência antibiótica detectados entre as bactérias isoladas foram para clindamicina com 63 (85,1%) cepas resistentes, tetraciclina com 26 (35,1%), ampicilina e vancomicina com 2 cepas resistentes cada (2,7%), cloranfenicol e eritromicina 1 (1,4%) cepa resistente. Gentamicina foi a droga mais efetiva com todos os isolados sendo susceptíveis a ela. 24 (32,4%) isolados foram considerados multidrogas resistentes, ou seja, resistentes a mais de uma família de antibióticos testados. Foi possível verificar que a orla de Fortaleza apresenta fontes pontuais de descarte de águas contaminadas e que carregam bactérias entéricas com perfis de virulência e de resistência a antibióticos. Esses descartes representam risco para a saúde ambiental e humana sendo importante o monitoramento de deságues na orla em centros urbanos como uma etapa da gestão da qualidade ambiental e da saúde pública.

Palavras-chave: Águas costeiras; Enterobactérias; Virulência; Resistência a antibióticos.

ABSTRACT

Population growth in cities around the world generates high demands on existing natural resources, not to mention the environmental pressures that are generated and eventually affect the quality of life of these residents. It is important to keep in mind that this demand from the population, in most cases, exacerbates problems such as health, employment and basic sanitation. The disposal of waste by rainwater and sewage discharges reach rivers and seas, contaminating water resources, essential for the existence of all living organisms. In this context, this research had as main objective to study bacteria of the *Enterococcus* genus, indicators of contamination by sewage, in water from a rainwater gallery and the Maceió stream on the edge of Fortaleza. Additionally, virulence factors were detected and antibiotic resistance profiles were established among these bacterial isolates. Five continuous collections of water samples were carried out at two points of the waterfront that contribute to urban discharges: a gallery in front of Meireles beach (G1) and in the outlet of Riacho Maceió (G2). Levels of *Enterococcus*/100 mL above the limit established by current legislation were detected in 100% of the samples. From the colonies grown on the selective culture medium, 100 strains were isolated, 74 of which were identified as belonging to the *Enterococcus* genus; among them, 36 (48.65%) produced exopolysaccharide (EPS) and 20 (27.01%) were able to adhere to the polystyrene plate. The frequency of *Enterococcus* spp. presenting virulence factors was 54 (72.97%) for the gelatinase test, 36 (48.64%) for the caseinase test, 7 (9.45%) for the phospholipase test; and in the hemolysin test, 18 isolates (24.32%) presented β -hemolysis. The highest rates of antibiotic resistance detected among the isolated bacteria were for clindamycin with 63 (85.1%) resistant strains, tetracycline with 26 (35.1%), ampicillin and vancomycin with 2 resistant strains each (2.7%). chloramphenicol and erythromycin 1 (1.4%) resistant strain. Gentamicin was the most effective drug with all isolates being susceptible to it. 24 (32.4%) isolates were considered multidrug resistant, that is, resistant to more than one family of tested antibiotics. It was possible to verify that the coast of Fortaleza presents point sources of contaminated water disposal and that carry enteric bacteria with virulence and antibiotic resistance profiles. These discharges represent a risk to environmental and human health and it is important to monitor riverside drains in urban centers as a step in the management of environmental quality and public health.

Keywords: Coastal waters; Enterobacteria; Virulence; Antibiotic resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Placa em meio Ágar sangue contendo cultura pura de <i>Enterococcus</i> spp. ...	21
Figura 2	– Localização geográfica da galeria em frente à da praia do Meireles (G1) o deságue do riacho Maceió (G2) na cidade de Fortaleza-CE.	22
Figura 3	– Fluxograma dos procedimentos de isolamento e fenotípicos para a determinação de NMP/100 mL nas amostras das águas das galerias: em frente à praia do Meireles (G1) e galeria Riacho Maceió (G2) na cidade de Fortaleza-CE.	24
Figura 4	– Fluxograma da técnica do antibiograma realizado com os isolados das amostras de água das galerias: em frente à praia do Meireles (G1) e galeria Riacho Maceió (G2) na cidade de Fortaleza-CE.	26
Figura 5	– Exemplos de reação dos <i>Enterococcus</i> spp. – cor rosa, rubro no ágar m- <i>Enterococcus</i> (a); coco Gram-positivo (b); bile esculina (c); meio de tolerância ao sal (d).	30
Figura 6	– Teste de formação de exopolissacarídeos (EPS) pelas bactérias <i>Enterococcus</i> spp. em placas de ágar vermelho congo (AVC).	30
Figura 7	– Exemplos do teste de aderência em placa de micropoços de poliestireno (TMC) – cor violeta aderida (a) e camada de biofilme expressiva (b).	31
Figura 8	– Resultados de testes para detecção de fatores de virulência em <i>Enterococcus</i> spp. – fosfolipase positivo para halo opalescente (a); prova de gelatinase positivo para halo transparente (b); produção de caseinase positivo para halo transparente (c); produção de hemolisina, para alfa não há formação de halo, para beta há formação de halo transparente (d).	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Frequência de resistência antimicrobiana dos isolados de <i>Enterococcus</i> spp.	36
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Parâmetros dos fatores extrínsecos medidos nos pontos estudados: amostras de água da Praia do Meireles (G1) e do deságue do riacho Maceió (G2), em Fortaleza-Ceará.	27
Tabela 2	– Número Mais Provável (NMP) de <i>Enterococcus</i> /100 mL: amostras de água da Praia do Meireles (G1) e do deságue do riacho Maceió (G2), em Fortaleza-Ceará.	28
Tabela 3	– Formação de Biofilme por amostras do ponto G1 e do ponto G2.	31
Tabela 4	– Resultado do teste de aderência em placa de micropoços de poliestireno para as cepas isoladas dos pontos G1 e G2..	32
Tabela 5	– Frequência de fatores fenotípicos de virulência de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas das amostras de água das galerias: da Praia do Meireles (G1), e do Riacho Maceió (G2), em Fortaleza-Ceará.	34
Tabela 6	– Perfis de virulência de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas das amostras de água das galerias: da Praia do Meireles (G1), e do Riacho Maceió (G2), em Fortaleza-Ceará.	34
Tabela 7	– Perfis de resistência de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas das amostras de água das galerias: da Praia do Meireles (G1), e do Riacho Maceió (G2), em Fortaleza-Ceará.	36
Tabela 8	– Perfis de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) com seus respectivos índices e percentuais.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
°C	graus Celsius
Agg	Substância Agregadora
ATCC	American Type Culture Collection
AVC	Ágar Vermelho Sangue
BHI	Infusão Cérebro e Coração
CCIH	Comissões de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CLI	Clindamicina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPS	Exopolissacarídeos
ERI	Eritromicina
Esp	Enterococcal Surface Protein
EUA	Estados Unidos da América
GEA	Genomic Expression Archive
gelE	Gelatinase Enterococcus
GEN	Gentamicina
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
Lat	Latitude
Long	Longitude
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de Sódio
NMP	Número Mais Provável
PCR	Reação em Cadeia pela polimerase
ppm	Partes por Milhão
PYR	Pirrolidonil-Beta-Naftilamida
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
tet	Tetraciclina
TET	Tetraciclina
TMC	Microplacas de Poliestireno
UFC	Universidade Federal do Ceará
µg	Micrograma
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAN	Vancomicina
VRE	Enterococos Resistentes à Vancomicina
VSEFS	Enterococcus faecalis Sensíveis à vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	Aspectos Históricos	16
2.2	Características Gerais e fenotípicas do gênero <i>Enterococcus</i>	17
2.3	Patogenicidade	18
2.4	Resistência antibiótica das cepas de <i>Enterococcus</i>	19
2.5	Gênero <i>Enterococcus</i> em ambientes aquáticos	20
2.6	Aspectos Fenotípicos do Gênero <i>Enterococcus</i>	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	Área do Ponto de coleta das amostras	22
3.2	Determinação dos Fatores Extrínsecos	22
3.3	Procedimento de coleta	23
3.4	Determinação do número mais provável	23
3.5	Isolamento e identificação Bioquímica das cepas	23
3.6	Testes fenotípicos de formação de biofilme	25
3.6.1	<i>Formação de exopolissacarídeos (EPS)</i>	25
3.6.2	<i>Teste de aderência em Placas de Micropoços de Poliestireno (TMC)</i>	25
3.7	Verificação dos diferentes perfis de virulência entre as cepas identificadas.	25
3.8	Determinação da susceptibilidade das cepas frente a diferentes antimicrobianos	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1	Parâmetros dos fatores extrínsecos	27
4.2	Determinação do Número Mais Provável de <i>Enterococcus</i> spp.	28
4.3	Identificação fenotípica de bactérias pertencentes ao gênero de <i>Enterococcus</i> spp.	29
4.4	Formação de biofilme	30
4.4.1	<i>Formação de exopolissacarídeos (EPS).</i>	30
4.4.2	<i>Teste de aderência em placa de micropoços de poliestireno (TMC).</i>	31
4.5	Caracterização fenotípica dos fatores de virulência dos isolados de <i>Enterococcus</i> spp.	33

4.6	Determinação da susceptibilidade das cepas frente a diferentes antimicrobianos.	35
5	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população nas cidades ao redor do mundo gera altas demandas sobre os recursos naturais existentes, sem contar as pressões ambientais que podem ser geradas e, eventualmente, afetar a qualidade de vida desses moradores (COSTA, 2013).

É importante ter em mente que essa demanda da população, na maioria das vezes, agrava problemas como saúde, emprego e saneamento básico, principalmente no que diz respeito ao descarte de resíduos por águas pluviais, que em algum momento destinavam esse material para rios e mares (AMARAL; MARTINS; BARRELLA, 2019), prejudicando um dos recursos mais importantes que temos, a água, considerada essencial para a existência de todos os organismos vivos (FERREIRA FILHO *et al.*, 2018, CARR *et al.*, 2010).

A água também pode servir como um importante veículo para patógenos, sejam derivados de fezes humanas, vários animais ou produtos químicos potencialmente nocivos (TORRES *et al.*, 2015). Portanto, o monitoramento dos corpos d'água é essencial para contribuir com sua conservação (PADILHA *et al.*, 2017).

Alguns dos organismos presentes em ambientes marinhos são classificados como indicadores de contaminação e são utilizados para avaliar a qualidade microbiológica da água utilizada para atividades recreativas marinhas (USEPA, 2012; WHO, 2006). Como indicadores de contaminação, as bactérias do Gênero *Enterococcus* são regulamentadas em diferentes países como Canadá, Austrália e Brasil (CANADA, 2012; BRASIL, 2000; NHMRC; 2008; TORRES *et al.*, 2015).

Os microrganismos pertencentes a este gênero são anaeróbios facultativos, Gram-positivos, presentes na forma de cocos isolados, aos pares ou em pequenas cadeias (TORRES *et al.*, 2015). Eles foram escolhidos como indicador de contaminação por serem abundantes em fezes humanas e animais de sangue quente, de fácil cultivo em ambiente laboratorial, e por poderem carrear material genético relacionados a de virulência que podem ser transmitidos a outros microrganismos. A exposição a essas bactérias em águas marinhas e doces pode ter correlação com os eventos de doenças entre os usuários o que torna este grupo bacteriano uma importante ferramenta para avaliação da qualidade microbiológica de águas recreativas (WADE *et al.*, 2003, 2010).

Algumas cidades litorâneas convivem com problemas de poluição das águas dos rios e isso pode acarretar o despejo de esgoto urbano no mar, podendo afetar a qualidade da água para fins recreativos (PADILHA *et al.*, 2017).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou a necessidade de avaliar a presença de bactérias do gênero *Enterococcus*, indicadores de contaminação por esgotos, em águas de uma galeria pluvial e do deságue do riacho Maceió na orla de Fortaleza, Ceará.

Com relação aos objetivos específicos, citam-se:

- (1) Determinar o Número mais Provável;
- (2) Isolar e identificar fenotipicamente em gênero *Enterococcus* os isolados procedentes das amostras de galerias;
- (3) Testar a capacidade de formação de biofilme bacteriano das cepas identificadas;
- (4) Verificar a presença de diferentes perfis de virulência;
- (5) Determinar a susceptibilidade das cepas frente a diferentes antimicrobianos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos Históricos

O termo "*Enterococcus*" foi usado pela primeira vez em 1899 por microbiologistas franceses, que escolheram esse nome para enfatizar a origem intestinal desse microrganismo gram-positivo e o colocaram no gênero *Streptococcus*. O nome *Streptococcus faecalis* foi mencionado por Andrewes e Horder em 1906 quando descreveram um organismo isolado do sangue de um paciente com endocardite e considerado "característico" do intestino humano. Durante essa década vários autores estudaram e escreveram sobre esses isolados e se referiram a eles como *S. faecalis*, mas em 1919 Orla Jensen usou terminologia diferente, descrevendo cepas de *Streptococcus glycerinaceus* e *Streptococcus faecium*. Por cerca de 20 anos esses nomes foram ignorados e todos considerados como *S. faecalis* (MURRAY, 1990; PATEL *et al.*, 1997).

Em 1930, Sherman correlacionou *Streptococcus* com o sistema sorológico desenvolvido por Lancefield. Neste sistema, os enterococos reagem com anti-soros do grupo D, enquanto outros estreptococos reagem com os anti-soros do grupo A, B, C, E, F ou G, com exceção de *Streptococcus viridans* e *Streptococcus pneumoniae*. Dentro do grupo de enterococos, Sherman reconheceu *S. faecalis*, *Streptococcus liquefaciens*, *Streptococcus zymogenes* e *Streptococcus durans*. Em 1937, Sherman propôs um esquema de classificação que dividia esse grupo de microrganismos em quatro divisões: piogênicos, viridans, lácticos e enterococos. A última palavra foi usada para (pelo menos a maioria) organismos crescendo entre 10°C e 45°C, a uma concentração de 6,5% de NaCl e pH de 9,6. Além disso, esses microrganismos sobreviveram 30 minutos a 60°C e tiveram a capacidade de hidrolisar a esculina (PATEL *et al.*, 1997).

Em 1984, Schleifer e KilpperBälz usaram a hibridização de DNA-DNA e DNA-rRNA para mostrar que *S. faecalis* e *S. faecium* estavam se distanciando ainda mais do gênero *Streptococcus* e propuseram a transferência dessas espécies desse gênero para sua localização natural no gênero *Enterococcus*. Com isso as espécies foram denominadas *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus maloduratus* e *Enterococcus gallinarum* (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2003; MURRAY, 1990; PATEL *et al.*, 1997). Este trabalho foi publicado durante a redação do *Bergey's Manual* em 1984 e o gênero *Enterococcus* não foi incluído na nomenclatura oficial, mas foi citado no *Manual* e considerado para apoiar a criação de um

gênero de organismos diferente do grupo dos enterococos. Conforme os estudos de ácidos nucléicos, outras espécies foram indicadas para serem incluídas no gênero: *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus solitarius* e *Enterococcus pseudoavium* (PATEL *et al.*, 1997). *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies mais comuns, representando cerca de 80 a 90% e 5 a 10% da maioria das infecções humanas, respectivamente. As outras espécies (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium* e *E. raffinosus*) são menos frequentemente isoladas, responsáveis por menos de 5% dos achados clínicos (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2003; D'AZEVEDO *et al.*, 2004; GARCIA-GARROTE; CERCENADO; BOUZA, 2006).

2.2 Características Gerais e fenotípicas do gênero *Enterococcus*

Murray (1990) mostrou que as bactérias do gênero *Enterococcus* são: ovaladas e podem aparecer como células únicas, agrupadas em pares ou em cadeias curtas. São bactérias Gram-positivas, não esporulantes e embora possam ter pseudocatalase, geralmente são catalase negativas (HARDIE; WHILEY, 1997; MURRAY, 1990). Essas bactérias compartilham numerosos e diversos habitats e, portanto, enterococos podem ser encontrados em amostras de origem humana (CARVALHO *et al.*, 2006; TYRREL *et al.*, 2002), animal (FORTINA; MORA; MANACHINI, 2004; KOORT *et al.*, 2004; RAHKILA *et al.*, 2011), de plantas (MÜLLER *et al.*, 2001; ŠVEC *et al.*, 2012), de insetos (ŠVEC *et al.*, 2006; COX ; GILMORE, 2007), do solo (COLLINS; FARROW; JONES, 1986; LAYTON *et al.*, 2010), de água potável (ŠVEC *et al.*, 2006), de água superficial (ŠVEC *et al.*, 2001) e de água do mar (ŠVEC *et al.*, 2005).

A prevalência de enterococos é observada em todo o mundo. Em 2005, 396 isolados de enterococos foram identificados na China: *E. faecalis* 79,8%, *E. faecium* 11,1%, *E. hirae* 3,0%, *E. gallinarum* 3,0% e *E. casseliflavus* 3,0% (ANBUMANI *et al.*, 2005). Em 2005, um estudo no norte da Índia mostrou que de um total de 105 espécies de enterococos identificadas, 42,9% eram *E. faecium* e 40% *E. faecalis* (MOHANTY *et al.*, 2005). *Enterococcus faecium* foi o isolado predominante das infecções da corrente sanguínea e do ambiente hospitalar, enquanto que *E. faecalis* foi predominante nas amostras de urina e pus.

Acredita-se que a maioria das infecções seja endógena, com a bactéria sendo transmitida através das células epiteliais do intestino, causando infecção através dos linfonodos para que possa se espalhar para outras células do corpo (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999).

2.3 Patogenicidade

O trato gastrointestinal é, sem dúvida, considerado o maior reservatório de enterococos e a detecção de *E. faecium* em espécimes clínicos positivos sem transporte fecal demonstra a aquisição de colonização gastrointestinal exógena e subsequente infecção endógena (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2003). Dependendo da associação parasita-hospedeiro podem ocasionar infecções, como endocardite, infecções do trato urinário, infecções intra-abdominais, infecções de feridas e bacteremia (HÖRNER *et al.*, 2005; MISKEEN; DEODHAR, 2001; VAN HORN; GEDRIS; RODNEY, 1996).

A produção de biofilme é uma das principais causas de infecções endodônticas e do trato urinário e endocardite (FISHER; PHILLIPS, 2009). Existem fatores de virulência secretados por diferentes espécies de *Enterococcus*: citolisinas, também chamadas de hemolisinas (KOCH *et al.*, 2004), e enzimas hidrolíticas (hialuronidases, gelatinases e proteases séricas (MUNDY; SAM; GILMORE, 2000; SEMEDO *et al.*, 2003).

No Brasil, em um estudo de 2003 em São Paulo que determinou a prevalência bacteriana de infecções do trato urinário nosocomiais em 188 pacientes, foram encontradas 11 estirpes de enterococos (DIAS NETO *et al.*, 2003). Em 2004, dois hospitais no Brasil isolaram 99 estirpes de *swabs* retais de pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) sendo identificadas através de testes bioquímicos como 76% *E. faecalis*, 9% *E. faecium* e 15% outras espécies (*E. hirae*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. avium*) (WEBER; GOLD, 2003). No mesmo ano, 455 estirpes de enterococos isolados foram identificados em Porto Alegre sendo *E. faecalis* 92,8%, *E. faecium* 2,9%, *E. gallinarum* 1,5%, *E. hirae* 0,7%, *E. casseliflavus* 0,4%, *E. durans* 0,4% e *E. raffinosus* 0,2% (D'AZEVEDO *et al.*, 2004). Ainda em Porto Alegre, neste mesmo ano, um outro estudo identificou 80 cepas de enterococos como *E. faecalis* 50%, *E. faecium* 17,5%, *E. gallinarum* 11,3%, *E. avium* 6,3%, *E. hirae* 5,0%, *E. durans* 3,7%, *E. raffinosus* 2,5%, *E. casseliflavus* 2,5% e *L. garvieae* 1,2% (D'AZEVEDO *et al.*, 2004).

Outros fatores conhecidos, adquiridos por trocas genéticas, também contribuem com a patogenicidade dos enterococos e muitos estudos têm mostrado que diversos fatores de virulência têm sido expressados pela espécie *E. faecalis*, como a gelatinase (GelE), lisinas (hemolisina / bacteriocina) (CylLL), substâncias de agregação (Agg), produção de feromônio (Eep) e proteínas de superfície de *Enterococcus* como Ace e Esp (LÉPESOVÁ, *et al.* 2018)).

2.4 Resistência antibiótica das cepas de *Enterococcus*

A barreira que separa *Enterococcus*, um grupo inofensivo de bactérias comensais do trato gastrointestinal de animais de sangue quente daquelas bactérias patogênicas que causam infecções graves de importância clínica, está se tornando cada vez mais frágil (GIRAFFA, 2002).

Após a introdução bem-sucedida de agentes antimicrobianos na terapia de infecções diferentes, vários patógenos demonstraram uma diversidade de estratégias de resistência antimicrobiana, incluindo modificação e inativação de drogas, exclusão de antibióticos e modificação de alvos (GROHMANN; MUTH; ESPINOSA, 2003).

A plasticidade genética do gênero *Enterococcus*, sua capacidade de adquirir e/ou desenvolver rapidamente resistência a antibióticos clinicamente importantes e de transferir esses determinantes de resistência para outros microrganismos mais patogênicos, tornam o tratamento terapêutico de infecções causadas por eles um desafio (KOCH *et al.*, 2004).

A resistência no gênero *Enterococcus* pode ser dividida em dois tipos gerais. Resistência congênita ou intrínseca, presente em todas ou na maioria das espécies, e na resistência adquirida (MURRAY, 1990).

A importância dos enterococos decorre não apenas de sua alta incidência em infecções humanas nos últimos anos, mas também de seu potencial de disseminação por contato (PENAS *et al.*, 2013) e também de sua capacidade de desenvolver resistência a antibióticos: enterococos resistentes à vancomicina (VRE) de uso comum (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2003; DIEKEMA *et al.*, 2004; TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004). A transmissão de VRE por profissionais de saúde cujas mãos ficam transitoriamente contaminadas com o organismo quando em contato com pacientes afetados é provavelmente a via mais comum de transmissão de infecção hospitalar (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2003).

Em 1995, em resposta ao rápido aumento de VRE, o Subcomitê de Prevenção e Controle a Resistência a Antimicrobianos do Hospital *Infection Control Practices Advisory Committee* do CDC publicou as seguintes recomendações para controlar a transmissão nosocomial de VRE: uso prudente de vancomicina, treinamento de equipe hospitalar, a utilização efetiva do laboratório de microbiologia e implementação de medidas de controle de infecção (incluindo uso de luvas e roupas de isolamento adequadas para condições específicas de pacientes) (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2003; TILLOTSON, 1982; WHEELER *et al.*, 2002), além de enfatizar a ideia de que minimizar a transmissão nosocomial de VRE requer

uma equipe multidisciplinar envolvendo vários departamentos (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2003).

Os enterococos não são nativos à água e estão entre as bactérias indicadoras fecais (LUNA *et al.* 2010); tanto doenças gastrointestinais como respiratórias têm sido associadas à exposição à água ou sedimentos contaminados (HEANEY *et al.* 2009). Como a água do mar e os sedimentos são possíveis veículos de estirpes virulentas transmissíveis aos seres humanos, é útil obter informações sobre a presença e distribuição de enterococos e sobre seus mecanismos de resistência aos antibióticos nos ecossistemas marinhos, particularmente em sedimentos, que são uma fonte de nutrientes orgânicos e exercem um efeito protetor sobre os microrganismos (LUNA *et al.* 2010; PIANETTI *et al.* 2004).

2.5 Gênero *Enterococcus* em ambientes aquáticos

A segurança na qualidade microbiológica dos corpos d'água utilizados para fins recreativos é uma preocupação global (LAYTON *et al.*, 2010). Vários estudos (COLFORD *et al.*, 2012; DUFOUR; WADE; KAY, 2012; FLEISHER *et al.*, 2010; WADE *et al.*, 2003, 2006, 2010) destacam a correlação positiva entre a densidade de enterococos e a incidência de doenças e infecções em indivíduos expostos por atividades de contato primário em águas doces e marinhas, indicando a eficácia dessas bactérias como possíveis indicadores de contaminação fecal por microrganismos patógenos.

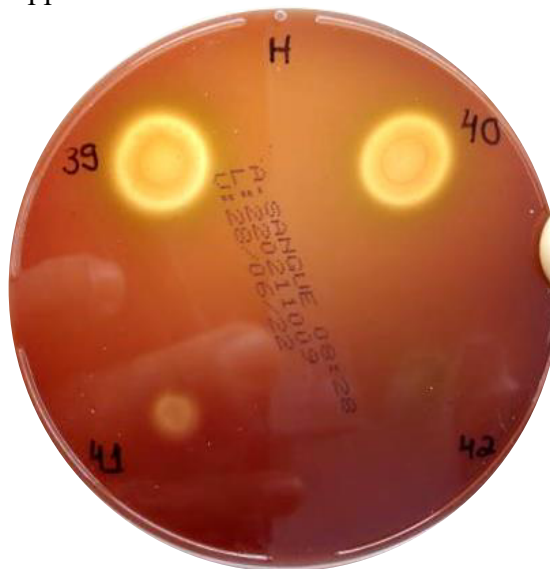
O estudo da propagação das doenças da água recreativa remonta a mais de 60 anos, com estudos iniciais sendo realizados nos EUA (STEVENSON, 1953) e no Reino Unido (PHSL, 1959). Os estudos iniciais observaram associações de resposta à exposição entre enterococos e *E. coli*, indicadores bacterianos comumente usados para indicar contaminação fecal de água e gastroenterite em banhistas. Como resultado, esses microrganismos têm sido amplamente utilizados para monitorar a qualidade das águas recreativas. Desde então, estudos mais detalhados foram realizados examinando diferentes indicadores de contaminação fecal, diferentes usuários de água e diferentes corpos hídricos ambientais. Estudos relatados no período 1990-2010 foram usados para desenvolver diretrizes (WHO, 2009) e padrões (ESSCHERT *et al.*, 2020; LUŠIĆ *et al.*, 2013) destinados a limitar os riscos à saúde da exposição à água recreativa (FEWTRELL; KAY, 2015).

2.6 Aspectos Fenotípicos do Gênero *Enterococcus*

As bactérias do gênero *Enterococcus* consistem em organismos gram-positivos que ocorrem como cocos isolados ou agrupados em cadeias curtas. A morfologia microscópica desses organismos é muitas vezes indistinguível de algumas espécies de *Streptococcus*. Eles são rotineiramente isolados em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado a uma temperatura ideal de 35°C por 24 h, (D'AZEVEDO *et al.*, 2004; FACKLAM *et al.*, 1999) embora a maioria cresça entre 10°C e 45°C (FACKLAM *et al.*, 1999). As colônias são geralmente não hemolíticas, mas podem ser alfa (hemólise parcial) ou beta hemolítica (hemólise completa) (CAMARGO; DARINI, 2005) (Figura 1).

São facultativamente anaeróbios e performam negativo na catalase (FACKLAM *et al.*, 1999; GARCIA GARROTE; CERCENADO; BOUZA, 2000). Estas bactérias têm a capacidade de crescer em meios com altas concentrações de sal (6,5% NaCl) em pH 9,6 e de hidrolisar esculina na presença de 40% de bile (em meio bile-esculina) (FACKLAM *et al.*, 1999). Estas são propriedades fundamentais que nos permitem distinguir os enterococos de outros cocos Gram-positivos e catalase-negativos. Testes fenotípicos específicos são necessários para distinguir espécies de enterococos, por exemplo, reações de fermentação de carboidratos, hidrólise de pirrolidionil-beta-naftilamida (PYR) e a presença de Pigmento Amarelo (CAMARGO; DARINI, 2005).

Figura 1 - Placa em meio Ágar sangue contendo cultura pura de *Enterococcus* spp.



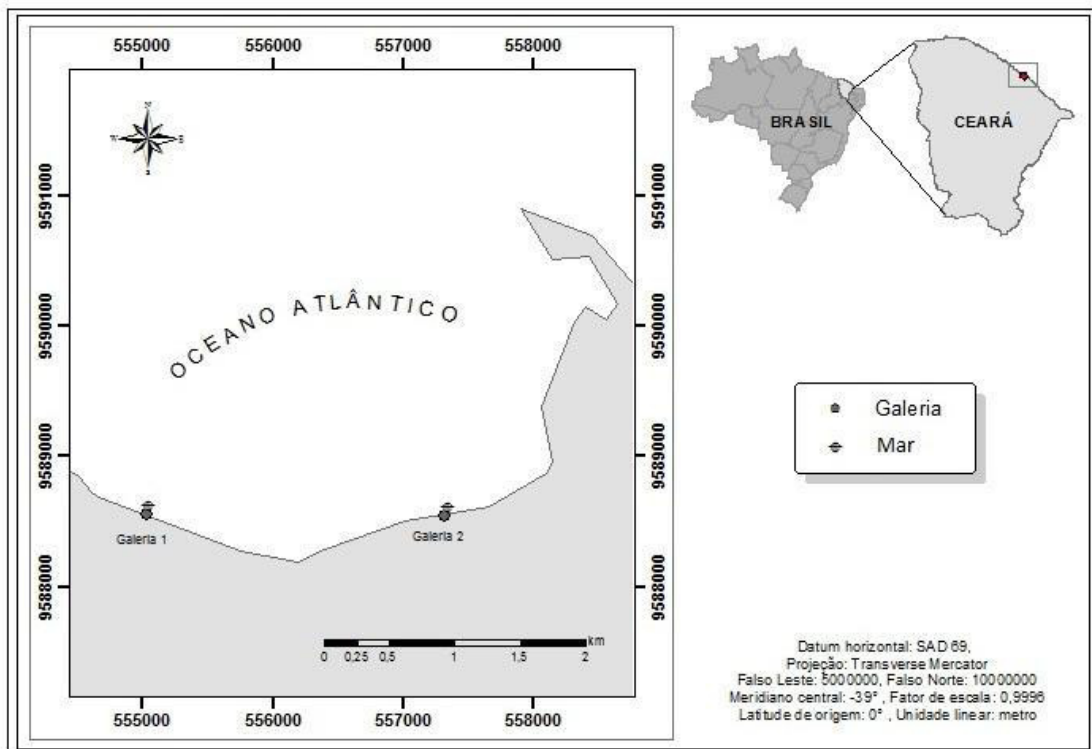
Fonte: Autor (2022).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área do Ponto de coleta das amostras

Foram selecionados dois pontos na orla da cidade de Fortaleza: uma galeria pluvial em frente à praia do Meireles (G1) e o deságue do riacho Maceió (G2) (Figura 2). Os pontos de coleta, G1 e G2, estão localizados nas coordenadas: lat. $-3^{\circ} 43' 21.9174''$ long. $-38^{\circ} 29' 3.048''$ e lat. $-3^{\circ} 43' 21.6768''$ long. $-38^{\circ} 30' 17.2038''$, respectivamente.

Figura 2 – Localização geográfica da galeria em frente à da praia do Meireles (G1) o deságue do riacho Maceió (G2) na cidade de Fortaleza-CE.



Fonte: Elaborado por TORRES RODRÍGUEZ (2015).

3.2 Determinação dos Fatores Extrínsecos

No momento da coleta foi realizada a medição da temperatura das amostras de água com auxílio de um termômetro (Incoterm). Em laboratório foram medidas a salinidade através de um refratômetro da marca ATAGO S/MILL e o pH utilizando-se um potenciômetro da marca MARCONI – PA 200P.

3.3 Procedimento de coleta

Foram realizadas cinco coletas contínuas com periodicidade semanal, entre novembro/21 e janeiro/22, em dois pontos previamente selecionados: Galeria em frente à praia do Meireles (G1) e riacho Maceió (G2). Foi coletada, em cada ponto, uma amostra usando um frasco de vidro âmbar esterelizado com capacidade de 1L. Depois da coleta, as amostras foram transportadas para o laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.4 Determinação do número mais Provável

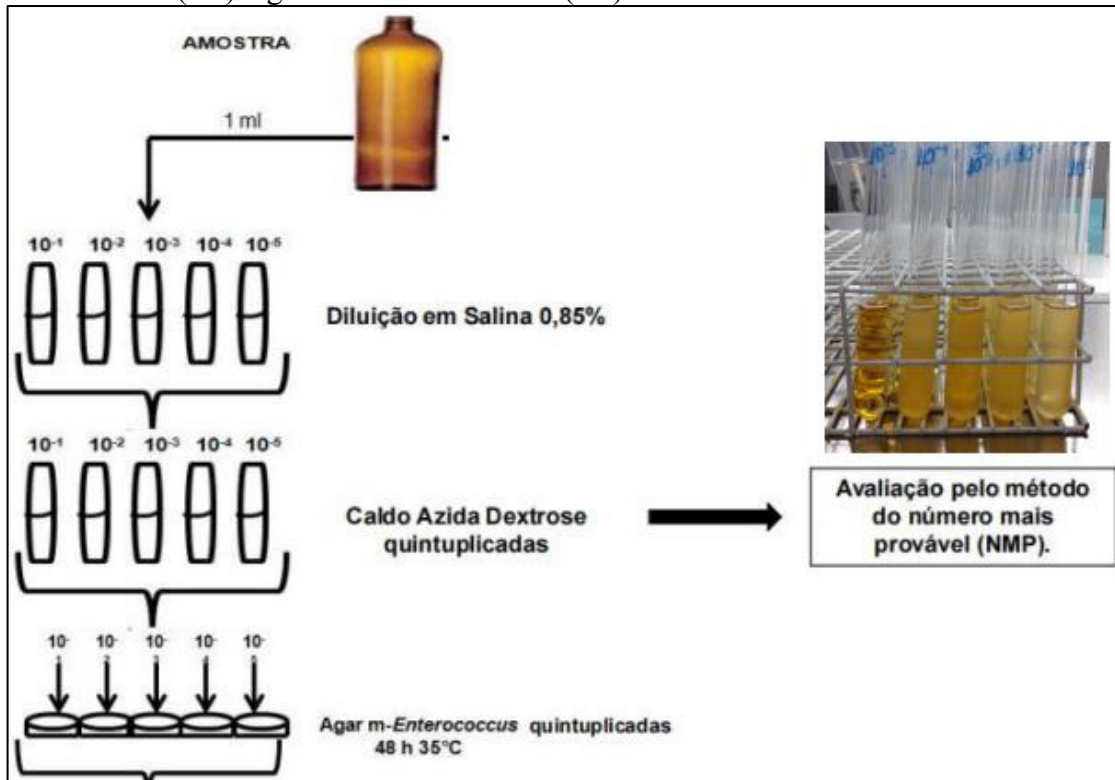
Após a chegada ao laboratório a água foi homogeneizada e foram realizadas diluições seriadas em salina a 0,85% (10^{-1} a 10^{-5}). Posteriormente, cada diluição em salina 0,85% foi inoculada em quintuplicatas nas mesmas diluições (10^{-1} a 10^{-5}) em Caldo Azida Dextrose e colocadas em estufa a 35°C/48h.

A azida sódica inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas, permitindo o crescimento dos enterococos. A presença destes microrganismos é indicada pela turvação do caldo e avaliada de acordo com o método do número mais provável (NMP), segundo WHO (2000).

3.5 Isolamento e identificação Bioquímica das cepas

Realizada a leitura dos resultados, inóculos do caldo foram estriados sobre a superfície de placas contendo *Ágar m-Enterococcus* (BD-Difco) como meio seletivo, com incubação por 48 h a 35 °C. Colônias com coloração vermelha, castanha ou rosa, foram quantificadas e replicadas em caldo e *Agar Brain Heart Infusion* (BHI - meio composto) com incubação a 35 °C por 24 h/cada para sua posterior confirmação em gênero.

Figura 3 – Fluxograma dos procedimentos de isolamento e fenotípicos para a determinação de NMP/100 mL nas amostras das águas das galerias: em frente à praia do Meireles (G1) e galeria Riacho Maceió (G2). na cidade de Fortaleza-CE.



Fonte: O Autor (2022).

A partir do crescimento foram selecionadas e isoladas colônias que foram mantidas em meio ágar BHI (Ágar *Brain Heart Infusion*, OXOID) para identificação e caracterização.

Os isolados bacterianos foram testados para as seguintes características do gênero *Enterococcus*: cocos Gram-positivos, agrupados aos pares ou cadeias curtas, catalase negativa, hidrólise da esculina, crescimento em caldo BHI a 45 °C por 24 horas e em presença de 6,5% de NaCl (MANNERO; BLANCH, 1999).

A identificação das cepas bacterianas foi realizada de acordo com o manual de Bergey's (GARRITY *et al.*, 2005), Mannero; Blanch (1999) e Koneman *et al.* (2001).

3.6 Testes fenotípicos de formação de biofilme

As bactérias isoladas foram testadas em relação à capacidade da formação de biofilme através dos seguintes testes fenotípicos: teste do Ágar Vermelho Congo e aderência em microplacas de poliestireno (TMC) (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989).

3.6.1 Formação de exopolissacarídeos (EPS)

Para o teste de formação de exopolissacarídeos, foi realizado o teste com Ágar Vermelho Congo (AVC), segundo a metodologia de Freeman, Falkiner e Keane (1989) com adaptações.

3.6.2 Teste de aderência em Placas de Micropoços de Poliestireno (TMC)

O teste de aderência em Placas de Micropoços de Poliestireno foi realizado de acordo com Christensen *et al.* (1985), com algumas adaptações.

A partir de 24 h de renovação das cepas em ágar BHI (OXOID), foram inoculados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e levados para estufa a 35 °C/48h-72h.

Em seguida, 200 µl da cultura foram inoculados (em triplicata) em uma microplaca de poliestireno de 96 poços estéril de fundo chato e levados a estufa a 35°C/48 h. Após esse tempo, as microplacas foram retiradas da estufa, descartado o caldo e os poços lavados três vezes com água destilada e depois secos em estufa a 60°C por 1 h. Após a secagem, os poços foram corados com solução de cristal violeta a 1% por 1 minuto. Foram realizadas sucessivas lavagens dos poços com água destilada e, em seguida, as placas foram colocadas para secar em temperatura ambiente. Após esses procedimentos, as placas foram verificadas e o resultado foi considerado positivo caso fosse observada a permanência do corante resultante da agregação de células bacterianas nas paredes dos micropoços.

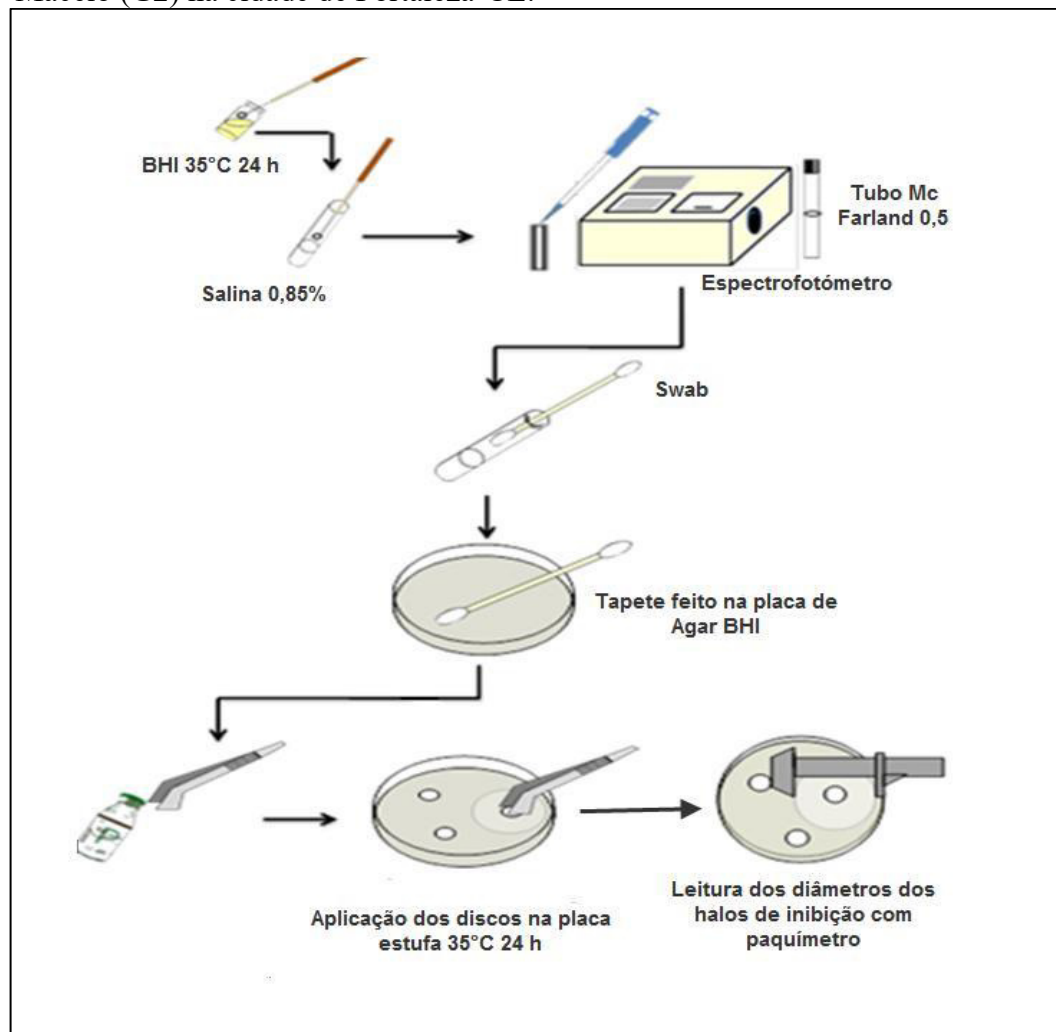
3.7 Verificação dos diferentes perfis de virulência entre as cepas identificadas

Foram detectados fatores de virulência através de testes *in vitro* nos isolados de *Enterococcus*, estudando as propriedades enzimáticas, através da verificação da produção de caseinase, fosfolipase, atividade hemolítica e gelatinase de acordo com metodologias anteriormente descritas (AUSTIN *et al.*, 2005; MENEZES *et al.*, 2014; MENEZES *et al.*, 2017). A cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle positivo para gelatinase.

3.8 Determinação da susceptibilidade das cepas frente a diferentes antimicrobianos

Os padrões de resistência a antimicrobianos das cepas trabalhadas foram estabelecidos usando-se discos de 7 antibióticos comerciais, Ampicilina (marca BBL) - AMP (10 μ g), Clindamicina (BBL) - CLI (2 μ g), Cloranfenicol (BBL) - CLO (30 μ g), Eritromicina (BBL) - ERI (15 μ g), Gentamicina (BBL) - GEN (30 μ g), Tetraciclina (BBL) - TET (30 μ g), Vancomicina (BBL) - VAN (30 μ g). Os testes foram realizados de acordo com CLSI (2021) (Figura 4).

Figura 4 – Fluxograma da técnica do antibiograma realizado com os isolados das amostras de água das galerias: em frente à praia do Meireles (G1) e galeria Riacho Maceió (G2) na cidade de Fortaleza-CE.



Fonte: Elaborado por TORRES RODRÍGUEZ (2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Parâmetros dos fatores extrínsecos

No presente estudo, a água da galeria Meireles (G1) apresentou oscilações de temperatura entre 29 e 31 °C, o valor de pH ficou entre 7,42 e 8,01 e a salinidade entre 9 e 26 ppm. No deságue do Riacho Maceió (G2), a temperatura variou entre 30 e 33°C, enquanto o pH variou entre 7,63 e 8,03 e a salinidade permaneceu em 1 ppm, conforme tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros dos fatores extrínsecos medidos nos pontos estudados: amostras de água da Praia do Meireles (G1) e do deságue do riacho Maceió (G2), em Fortaleza-Ceará.

Semana	Parâmetros dos Fatores Extrínsecos	Praia do Meireles (G1)	riacho Maceió (G2)
1	Hora	12:20	13:05
	pH	8	8
	Salinidade (ppm)	19	1
	Temperatura (°C)	31	31
2	Hora	09:41	10:26
	pH	7,6	7,7
	Salinidade (ppm)	10	1
	Temperatura (°C)	30	30
3	Hora	08:43	09:05
	pH	7,85	7,63
	Salinidade (ppm)	20	1
	Temperatura (°C)	29	30
4	Hora	11:33	12:16
	pH	8,01	8,03
	Salinidade (ppm)	26	1
	Temperatura (°C)	30	33
5	Hora	11:45	13:37
	pH	7,42	7,9
	Salinidade (ppm)	9	1
	Temperatura (°C)	29	30

Fonte: O Autor (2022).

Silva *et al.* (2008) encontraram variação de 7,0 a 8,0 no pH da água nas praias do litoral maranhense quando examinaram sua contaminação por *Enterococcus*.

Já em 2013, Monteiro identificou enterococos nas praias do litoral cearense e os valores encontrados para o pH da água do mar variaram de 7,60 a 8,40, a salinidade variou de 36 a 39 e as temperaturas variaram de 27°C a 28°C. O gênero *Enterococcus* possui longo tempo de sobrevivência em águas marinhas, crescem em temperaturas entre 10 e 45°C, toleram pH de 9,6 e salinidade de até 6,5% (FACKLAM; ELLIOTT, 1995). Em vista disso, as variações de pH (7,42 e 8,03), salinidade (1 e 26) e temperatura (29°C e 33°C) registradas nas águas neste estudo estão coerentes com registros de outros trabalhos de pesquisa, demonstrando que esses parâmetros ambientais favorecem a permanência de bactérias *Enterococcus*.

4.2 Determinação do Número Mais Provável de *Enterococcus* spp.

Os valores de NMP/100 mL para a população de enterococos variaram de $<1,1 \times 10^5$ a $92,0 \times 10^5$ nas amostras, tendo o ponto G1 apresentado maiores valores de *Enterococcus* NMP/100 ml em relação ao ponto G2 (Tabela 2).

Tabela 2 - Número Mais Provável (NMP) de *Enterococcus*/100 mL: amostras de água da Praia do Meireles (G1) e do deságue do riacho Maceió (G2), em Fortaleza-C/eará.

Semana	Número Mais Provável	Praia do Meireles	Riacho Maceió
		G1	G2
1	NMP/ 100mL	1.100.000	110.000
2	NMP/ 100mL	9.200.000	700.000
3	NMP/ 100mL	33.000	330.000
4	NMP/ 100mL	1.100.000	110.000
5	NMP/ 100mL	9.200.000	2.200.000

Fonte: O Autor (2022).

É importante ressaltar que tanto o ponto G1 quanto G2 apresentaram valores de *Enterococcus*/100 ml em todas as coletas. Somente na terceira coleta, os números dessas

bactérias entéricas em G1 foram inferiores aos detectados no G2. As concentrações dessas bactérias ($92,0 \times 10^5$) foram registradas na primeira e quinta coletas no ponto G1.

Neste trabalho, níveis de *Enterococcus*/100 ml acima do limite legal (BRASIL, 2000) foram encontrados nas amostras de água das galerias em 100% das amostras, segundo a resolução N° 274, de 29 de novembro de 2000, do CONAMA. A regulamentação de enterococos se aplica apenas à avaliação de águas marinhas para classificar o ambiente como adequado ou inadequado para banho. Em trabalho realizado por Graves *et al.* (2010), os autores explicam que a distribuição dessas bactérias pode mudar devido a fatores ambientais e à distância das fontes de águas residuais. Já Carvalho *et al.* (2014) encontraram níveis mais elevados de enterococos em amostras coletadas próximas à saída do emissário submarino na costa de Fortaleza do que em pontos mais distantes.

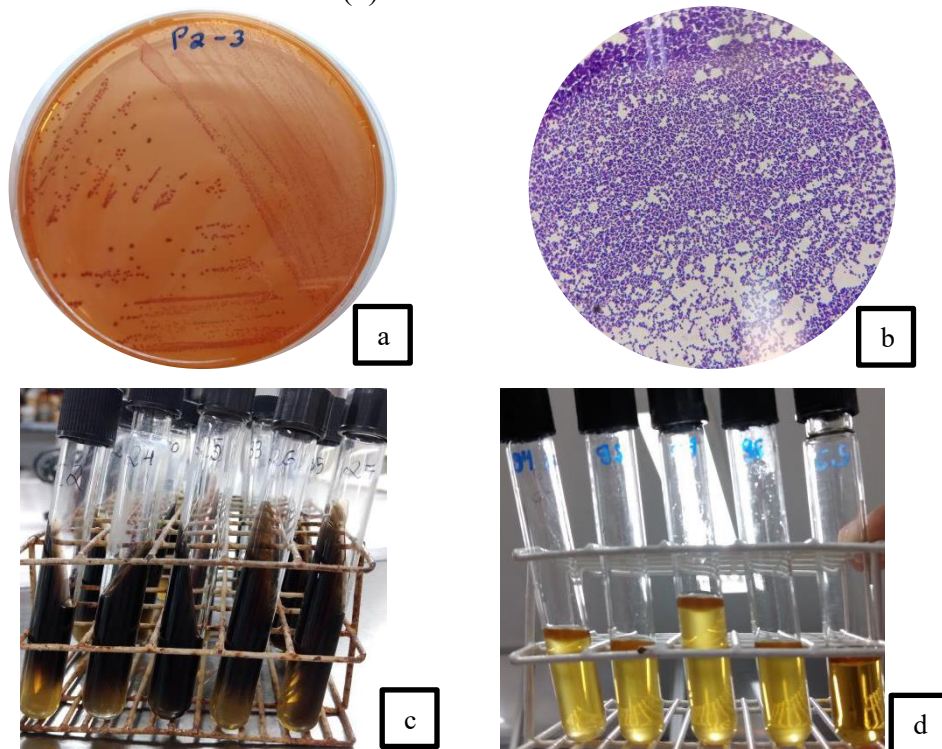
Anteriormente, Lima *et al.* (2009) encontraram maior presença de bactérias intestinais (*Enterococcus*) na microbiota de córregos de águas pluviais e as caracterizaram como fonte de contaminação fecal de águas costeiras.

4.3 Identificação fenotípica de bactérias pertencentes ao gênero de *Enterococcus* spp.

Ao total foram isoladas 100 cepas (50 do ponto G1 e 50 do ponto G2, sendo 74 cepas pertencentes ao gênero *Enterococcus* (33 cepas da galeria G1 e 41 cepas do ponto G2).

Os isolados de *Enterococcus* spp. foram confirmados quando se apresentaram como colônias avermelhadas, rosados, rubros em meio ágar m-*Enterococcus* (Figura 5a). A coloração de Gram foi usada para confirmar a morfologia (cocos) e a reação de Gram (Gram positivo) das 74 cepas, conforme figura 5b. O teste de catalase foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 10% e foi negativo para todas as cepas, ou seja, não ocorreu borbulhamento. Teste em ágar bile esculina, caracterizado por escurecimento do meio de cultura após incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas também foi positivo para 100% das cepas identificadas (figura 5c). O teste de crescimento a 45°C e a 10°C por 24 horas em caldo BHI interpretado pela turbidez do meio de cultura, crescimento na presença de cloreto de sódio 6,5 também foi positivo para todas as cepas identificadas (figura 5d).

Figura 5 - Exemplos de reação dos *Enterococcus* spp. – cor rosa, rubro no ágar m-*Enterococcus* (a); coco Gram-positivo (b); bile esculina (c); meio de tolerância ao sal (d).



Fonte: O autor (2022).

4.4 Formação de biofilme

4.4.1 Formação de exopolissacarídeos (EPS)

A cor escura foi evidente nas cepas produtoras de exopolissacarídeos (EPS) (Figura 6). De acordo com Arciolla *et al.* (2002), essa coloração resultou da produção de EPS pela cepa bacteriana.

Figura 6 - Teste de formação de exopolissacarídeos (EPS) pelas bactérias *Enterococcus* spp. em placas de ágar vermelho congo (AVC).



Fonte: O autor (2022).

Em Ágar vermelho congo, com adição de sacarose, 36 (48,65%) das 74 cepas pertencentes ao gênero *Enterococcus* apresentaram coloração enegrecida entre 48 a 96 horas, evidenciando a produção de EPS pela bactéria (13 do ponto G1 e 23 do ponto G2) (Tabela 3).

Tabela 3 - Formação de Biofilme por amostras do ponto G1 e do ponto G2.

Formação de Biofilme	n° de amostras	Cepas (G1)	Cepas (G2)	% Total das amostras
Produção de Exopolissacarídeos	36	13	23	48,64

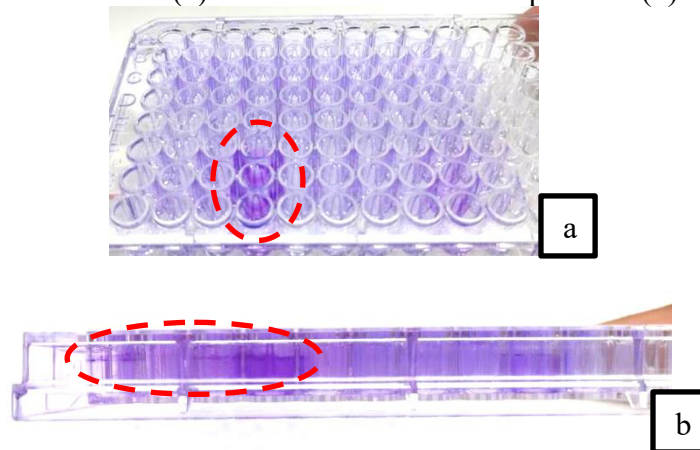
Fonte: Autor (2022).

Os exopolissacarídeos podem ser formados por diferentes tipos de bactérias e servem como estratégia de sobrevivência contra antibióticos (COSTERTON *et al.*, 1987; KASNOWSKI *et al.*, 2010). Em trabalho realizado por Barros *et al.* (2014), os autores encontraram uma correlação positiva entre a produção de biofilme e a resistência a antibióticos, o que reduz a suscetibilidade bacteriana.

4.4.2 Teste de aderência em placa de micropoços de poliestireno (TMC)

A avaliação quantitativa da adesão à placa de poliestireno (figura 7a e 7b) mostrou que das 74 cepas de *Enterococcus* spp., 6 cepas da galeria G1 e 14 cepas da galeria G2, totalizando 20 (27,01%) aderiram e 54 (72,99%) não aderiram. Os resultados estão listados na tabela 4.

Figura 7 - Exemplos do teste de aderência em placa de micropoços de poliestireno (TMC) – cor violeta aderida (a) e camada de biofilme expressiva (b).



Fonte: O autor (2022).

Tabela 4 - Resultado do teste de aderência em placa de micropoços de poliestireno para as cepas isoladas dos pontos G1 e G2.

Galerias	Aderência em Poços	Cepas
G1	3	45, 86
	2	—
	1	1, 10, 41, 44
	Nenhum	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 42, 43, 46, 49, 50, 62, 63, 81, 84, 87, 88, 89
G2	3	14, 19, 40, 51, 97
	2	36, 37, 38
	1	52, 53, 72, 92, 96, 100
	Nenhum	11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 31, 33, 35, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 73, 76, 77, 80, 91, 93, 94, 95, 98, 99

Fonte: O autor (2022).

A importância dos biofilmes formados por enterococos se deve principalmente à sua resistência à ação de antibióticos quando encontrados em biofilmes (MOHAMED *et al.*, 2007). A formação de biofilmes em microrganismos associados a alimentos está relacionada principalmente ao fato de que esses microrganismos podem ficar presos em equipamentos de processamento de alimentos, tornando-os fontes de contaminação, além de sua maior resistência aos desinfetantes (DEWANTI; WONG, 1995), sendo um problema para a indústria. Alguns trabalhos publicados sobre a formação de biofilmes por *Enterococcus* em alimentos no Brasil (GOMES *et al.*, 2008; MIRANDA, 2018) confirmam os resultados deste estudo.

Sharise (2016), foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores *asa 1* e *agg*, que conferem a produção da substância de agregação, o gene *asa 1* esteve presente em 17,5% (7/40) dos isolados de enterococos, sendo o gene de virulência de maior frequência. Somente a espécie *E. seriolícida* não apresentou este gene.

O perfil mais frequentemente encontrado de multirresistência foi a CLI e TET. De forma geral, as cepas de *Enterococcus* isoladas dos pontos G1 e G2 apresentaram índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) variando entre 0,29 e 0,43. Valores acima de 0,2 caracterizam perfil de multirresistência (KRUMPERMAN, 1983) (Tabela 8).

Tabela 8 - Perfis de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) com seus respectivos índices e percentuais.

Pontos	Perfil	Quantidade de cepas	MAR	% das Cepas
G1	AMP + CLI + TET	1	0,43	0,01
	CLI + CLO + TET	1	0,43	0,01
	CLI + ERI + TET	1	0,43	0,01
	CLI + TET + VAN	1	0,43	0,01
	CLI + TET	8	0,29	0,11
	CLI + VAN	1	0,29	0,01
G2	AMP + CLI	1	0,29	0,01
	CLI + TET	11	0,29	0,15

Fonte: Autor (2022).

Legenda: AMP - ampicilina; CLI - clindamicina; CLO - cloranfenicol; ERI - eritromicina; TET - tetraciclina; VAN - vancomicina.

Hasanpour *et al.* (2021) mostraram as taxas de resistência de enterococos isolados do esgoto e da água superficial no Irã a outros antibióticos foram as seguintes: 71,7% para eritromicina, 41,9% para ampicilina, 25,7% para gentamicina, 49% para ciprofloxacina, 11,7% para cloranfenicol, 35,5% para tetraciclina, 83% para estreptomicina, 4,9% para teicoplanina, 0,4% para linezolida, 7,1% para quinupristina/dalfopristina, 47,8% para trimetoprim/sulfametoxazol, 40,3% para amoxicilina, 12,1% para nitrofurantoína e 87,1% para amikacina, concordando com resultados mostrados nesse trabalho.

Valenzuela *et al.* (2008) observaram diferentes perfis de resistência entre cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de alimentos. A maioria dos isolados de *E. faecalis* foi resistente à tetraciclina (86,95%), seguida de rifampicina (78,26%), ciprofloxacina (60,87%),

nitrofurantoína (43,47%), levofloxacina (39,13%), eritromicina (21,73%), estreptomicina (17,39%), cloranfenicol (8,69%), vancomicina (8,69%) e teicoplanina (4,34%). Cepas de *E. faecium* foram altamente resistentes à nitrofurantoína (73,33%), seguido por eritromicina (66,60%), ciprofloxacina (66,66%), levofloxacina (60,00%) e rifampicina (26,66%), vancomicina (6,66%) e teicoplanina (6,66%), tendo a tetraciclina uma pequena proporção (6,66%).

Embora a resistência natural à clindamicina seja conhecida e não seja um antibiótico de escolha para tratar infecções enterocócicas, é importante investigar a resistência a esse antibiótico devido à sua ampla distribuição ambiental. Soma-se a isso o fato da resistência cruzada com outras classes de antibióticos, macrolídeos e estreptograminas utilizados na prática clínica e veterinária (BRENCIANI *et al.*, 2007; GOMES, 2013; KRISTICH; RICE; ARIAS, 2014; LECLERCQ, 2002).

Os enterococos possuem resistência intrínseca aos β -lactâmicos, e a suscetibilidade varia entre as espécies e entre os antibióticos β -lactâmicos. Por exemplo, espécies como *E. faecium* podem ser ligeiramente mais resistentes que *E. faecalis* (KRISTICH; RICE; ARIAS, 2014).

A resistência antimicrobiana é citada como o fator de virulência mais comum, estando implicada no tratamento de doenças, sendo de grande importância conhecer a capacidade desses microrganismos em conservar genes que garantem alta resistência aos antimicrobianos (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000). Existem vários fatores de virulência que também podem ser adquiridos por meio de troca genética, incluindo: substância agregadora (Agg), gelatinase (GeE), proteína de superfície enterocócica (esp), citolisina e adesinas (LEAVIS *et al.*, 2004; FURUMURA *et al.*, 2006).

5 CONCLUSÃO

A galeria pluvial e o riacho Maceió são pontos de contribuição de bactérias entéricas do gênero *Enterococcus* na orla de Fortaleza e, portanto, fontes de disseminação de bactérias com potencial patogênico e genes de resistência a antibióticos.

Em análises dos isolados bacterianos foi possível constatar que cepas do gênero *Enterococcus* apresentaram fenótipos relacionadas a capacidade de provocar eventos de doença em humanos como produção de enzimas, estruturas de aderência e resistência à antimicrobianos. Essa pesquisa é uma contribuição ao monitoramento de fontes de bactérias entéricas nos ambientes costeiros e detecção dos riscos para a saúde da população e o ambiente.

REFERÊNCIAS

- AHMED, W.; SIDHU, J. P. S.; TOZE, S. Speciation and frequency of virulence genes of *Enterococcus* spp. isolated from rainwater tank samples in Southeast Queensland, Australia. **Environmental Science and Technology**, n. 46, p. 6843–6850, 2012.
- AMARAL, E. B. M.; MARTINS, F. L. C.; BARRELLA, W. Impacto ambiental antrópico na praia do Perequê–Guarujá–SP. **Unisanta BioScience**, v. 8, n. 2, p. 139-150, 2019.
- ANBUMANI, N. *et al.* Isolation, distribution and prevalence of various species of enterococci isolated from clinical specimens in a tertiary care hospital. **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 48, n. 4, p. 534-537, 2005.
- ARCIOLA, C. R. *et al.* Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. **Biomaterials**, v.23, n. 21, p. 4233-4239, 2002.
- AUSTIN, B. *et al.* Pathogenicity of vibrios to Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. **Environ Microbiol**, v.7, n. 9, 1488-1495, 2005.
- BARROS, A. L. R. *et al.* Resistência a metais pesados, antimicrobianos e formação de biofilme em cepas de *Escherichia coli* isoladas de praias de São Luis - Maranhão. **Revista de atologia Tropical**, v. 43, n. 3, p. 277-289, 2014.
- BETANCOURTH, M.; BOTERO, J. E.; RIVERA, S. P. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. **Colombia médica**, v. 35, n. 3 Supl 1, p. 34-39, 2004.
- BRASIL. **Resolução CONAMA No. 274**, de 29 de novembro de 2000. Estabelece condições de balneabilidade das águas brasileiras, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2000.
- BRENCIANI, A. *et al.* ICE Sp1116, the genetic element responsible for erm (B)-mediated, inducible resistance to erythromycin in *Streptococcus pyogenes*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6425-6429, 2012.
- BRENCIANI, A. *et al.* Genetic Elements Carrying erm(B) in *Streptococcus pyogenes* and Association with tet(M) Tetracycline Resistance Gene. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, v. 51, n.4, p. 1209-1206, 2007.
- CAMARGO, I. L. B. C. *et al.* Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 273-278, 2008.
- CAMARGO, I. L. B. C. Estudo dos fatores de virulência em *Enterococcus* sp isolados no Brasil. 2005. **Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2005. Acesso em: 05 jul. 2022
- CAMARGO, I. L. B. C. *et al.* *Enterococcus gallinarum* carrying the vanA gene cluster: first report in Brazil. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, n. 11, p. 1669-

1671, 2004.

CANADA. **Guidelines for Canadian Recreational Water Quality**. Third Edition, p. 5, 2012. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/publications/healthy-living/guidelines-canadian-recreational-water-quality-third-edition/guidelines-canadian-recreational-water-quality-third-edition-page-5.html>>. Acesso em: 05 jul. 2022.

CARR, M.R. *et al.* *Salmonella* rarely detected in Mississippi coastal waters and sediment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 2191-2199, 2010.

CARVALHO, E. M. R. *et al.* Multiple antibiotic-resistance of *Enterococcus* insolated from coastal water near an outfall in Brazil. **African Journal of Microbiology**. Oxford, v. 8, n. 17, p. 1825-1831, 2014.

CARVALHO, M.G.S. *et al.* *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Cambridge, v.56, p. 1505-1508, 2006.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical microbiology reviews**. Rev., v. 13, n. 4, p. 686-707, 2003.

CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of coagulase - negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CLSI/NCCLS – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement. 31st Ed. M100. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. v. 41, n. 3, p. 1110, 2021.

COLFORD JR, J. M. *et al.* Using rapid indicators for *Enterococcus* to assess the risk of illness after exposure to urban runoff contaminated marine water. **Water research**, v. 46, n. 7, p. 2176-2186, 2012.

COLLINS, M. D.; FARROW, J. A.E.; JONES, D. *Enterococcus mundtii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 8-12, 1986.

COSTA, M. D. S. Mobilidade urbana sustentável: um estudo comparativo e as bases de um sistema de gestão para Brasil e Portugal. **São Paulo: EESC/USP**, 2013.

COSTERTON, J. W. *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 435-464, 1987.

COX, CHRISTOPHER R.; GILMORE, MICHAEL S. Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 75, n. 4, p. 1565-1576, 2007.

D'AZEVEDO, P. A. *et al.* Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 199-204, 2004a.

- D'AZEVEDO, P. A. *et al.* Avaliação de um sistema automatizado na identificação de espécies de *Enterococcus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 237-239, 2004b.
- DADA, A. *et al.* Antibiotic resistance and virulence among *Enterococci* isolated from Teluk Kemang Beach, Malaysia. **Our Nature**, v. 10, n. 1, p. 217-232, 2012.
- DEWANTI, R.; WONG, A. CL. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7. **International journal of food microbiology**, v. 26, n. 2, p. 147-164, 1995.
- DIAS NETO, J. A. *et al.* Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, p. 36-38, 2003.
- DIEKEMA, D. J. *et al.* Rapid detection of antimicrobial-resistant organism carriage: an unmet clinical need. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 7, p. 2879-2883, 2004.
- DOWNES, F. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. **Washington: American Public Health Association**, 679 p., 2001.
- DUFOUR, A.; WADE, T. J.; KAY, D. Epidemiological studies on swimmer health effects associated with potential exposure to zoonotic pathogens in bathing beach water—a review. **Animal Waste, Water quality and Human Health**. London: IWA publishing, p. 415-28, 2012.
- ESSCHERT, K. L. V., *et al.* **Outbreaks associated with untreated recreational water—California, Maine, and Minnesota, 2018-2019**. Morbidity and Mortality Weekly Report, v. 69, n. 25, p. 781, 2020.
- FACKLAM, R. R. *et al.* Enterococci. In: FACKLAM, R. R. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington: ASM Press; p. 297 – 305, 1999.
- FACKLAM, R.; ELLIOTT, J. A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 479-495, 1995.
- FERREIRA FILHO, J. M. *et al.* Análise da balneabilidade das águas estuarinas da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Estadual Ponta do Tubarão – Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 11, n. 4, p. 1331-1342, 2018.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009.
- FLEISHER, J.M. *et al.* The BEACHES Study: health effects and exposures from non-point source microbial contaminants in subtropical recreational marine Waters. **Journal of Epidemiology**. Oxford, v. 39, p. 1291-1298, 2010.
- FORTINA, M. G.; MORA, R. D.; MANACHINI, P. L. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. **International Journal of Systematic and**

Evolutionary Microbiology. Cambridge, v. 54, p. 1717-1721, 2004.

FRANZ, C. M.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety?. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.47, n. 1-2, p. 1-24, 1999.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989.

FURUMURA, M. T. *et al.* Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 230-236, 2006.

GAMA, B. A. Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil.73f. 2008.

GARCIA GARROTE, F.; CERCENADO, E.; BOUZA, E. Evaluation of a new system, Vitek 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3263 – 3267, 2006.

GARCIA GARROTE, F.; CERCENADO, E.; BOUZA, E. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2108-2111, 2000.

GARRITY, G.M. *et al.* Systematic bacteriology. The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual Trust, **Department of Microbiology and Molecular Genetics**, v. 2, 2005.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002.

GOMES, M.J.P. Gênero *Streptococcus* spp. Faculdade de Veterinária (FAVET). **Universidade Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS)**, 76 p., 2013.

GOMES, B. C. *et al.* Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008.

GRAVES, A.K.; WEAVER, R.W. Characterization of enterococci populations collected from a subsurface flow constructed wetland. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 108, n. 4, p. 1226-1234, 2010.

GROHMANN, E.; MUTH, G.; ESPINOSA, M. Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 2, p. 277-301, 2003.

- HARDIE, J.M; WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**. Oxford, v.83, p. 1S-11S, 1997.
- HASANPOUR, F. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci in Iran: A systematic review and meta-analysis of non-clinical studies. **Gene Reports**, v. 24, p. 101265, 2021.
- HEANEY, C. D. *et al.* Contact with beach sand among beachgoers and risk of illness. **American journal of epidemiology**, v. 170, n. 2, p. 164-172, 2009.
- HÖRNER, R. *et al.* Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 391-395, 2005.
- KASNOWSKI, M. C. *et al.* Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 8, n. 15, p. 1-23, 2010.
- KOCH, S. *et al.* Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v. 22, n. 7, p. 822-830, 2004.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; SCHRECKENBERGER, C. WINN, JR. W. C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido – 5ª edição**. Editora Guanabara Koogan S.A. 1465p. 2001.
- KOORT, J. *et al.* *Enterococcus hermanni* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Cambridge, v. 54, p.1823-1827, 2004.
- KRISTICH, Ch. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar, N., editors. Bethesda, 2014.
- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and environmental microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165-170, 1983.
- LAYTON, B. A. *et al.* *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 2, p. 539-547, 2010.
- LEAVIS, H. *et al.* A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 672-682, 2004.
- LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical infectious diseases**, v. 34, n. 4, p. 482-492, 2002.
- LÉPESOVÁ, K. *et al.* Prevalence of antibiotic-resistant coliform bacteria, *Enterococcus* spp.

and *Staphylococcus* spp. in wastewater sewerage biofilm. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 14, p. 145-151, 2018.

LIMA, D.S.C. *et al.* Influência das galerias pluviais para poluição de origem fecal do Rio Acaraú, no trecho urbano de Sobral-Ceará. **Boletim Técnico Científico**. CEPNOR, Belém, v.9, p.151-157, 2009.

LUNA, G. M. *et al.* Extraintestinal *Escherichia coli* carrying virulence genes in coastal marine sediments. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 17, p. 5659-5668, 2010.

LUŠIĆ, D. V., *et al.* Evaluation of equivalence between different methods for enumeration of fecal indicator bacteria before and after adoption of the new Bathing Water Directive and risk assessment of pollution. **Marine pollution bulletin**, v. 73, n. 1, p. 252-257, 2013.

MANNERO, A.; BLANCH, A.R. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington: v.65, n. 10, p. 4425-4430, 1999.

MANTAREVA, V. *et al.* Non-aggregated Ga (III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 1, p. 91-102, 2011.

MENEZES, F.G.R. *et al.* Detection of virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae* from estuaries in Northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 427-432, 2014.

MENEZES, F.G.R. *et al.* Pathogenic *Vibrio* species isolated from estuarine environments (Ceará, Brazil)-antimicrobial resistance and virulence potential profiles. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.89, n. 2, p. 1175-1188, 2017.

MIRANDA, M. F. Potencial atividade antibiofilme de extratos de macroalgas marinhas contra bactérias em ambientes na indústria de pescada. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca)-Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 55f, 2018.

MISKEEN, P. A.; DEODHAR, L. Studies on the Incidence of *Enterococcus* species in urinary tract infections, and their identification by a test scheme. **Bombay Hospital Journal**, v. 43, n. 1, p. 124-127, 2001.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581-1588, 2007.

MOHANTY, S. *et al.* Species prevalence and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated in a tertiary care hospital of North India. **Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 36, n. 4, p. 962, 2005.

MÜLLER, T. *et al.* Identification of plant associated enterococci. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 268-278, 2001.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence

and antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.

MURRAY, B.E. The Life and Times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 3, n.1, p. 46-65, 1990.

NHMRC. National Health and Medical Research Council. **Guidelines for Managing Risks in Recreational Water**. Australian Government, 2008. 216 p.

PADILHA, S. R. *et al.* Evaluation of balneability condition on enseada beach (bertioga/sp) over the period of 2004 to 2013. **Revista UNG – Geociências**, Guarulhos-SP: v. 16, n. 1, p. 25-45, 2017.

PATEL, R. *et al.* Multiplex PCR Detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 genes in Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 703-707, 1997.

PENAS, P. P. *et al.* Analysis of genetic lineages and their correlation with virulence genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolates from root canal and systemic infections. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 7, p. 858-864, 2013.

PIANETTI, A. *et al.* Microbial characteristics of marine sediments in bathing area along Pesaro-Gabicce coast (Italy): a preliminary study. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 682-689, 2004.

RAHKILA, R. *et al.* Identification of enterococci from broiler products and a broiler processing plant and description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1196-1203, 2011.

SEMEDO, T. *et al.* Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus?. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 13-22, 2003.

SILVA, V. C. *et al.* Contaminação por *Enterococcus* da água das praias do município de São Luís, Estado do Maranhão. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, n. 2, p. 187-192, 2008.

STEVENSON, A. H. Studies of bathing water quality and health. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 43, n. 5, Pt 1, p. 529-538, 1953.

ŠVEC, P. *et al.* *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. Pt_7, p. 1499-1505, 2012.

ŠVEC, P. *et al.* *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. 3, p. 577-581, 2006.

ŠVEC, P. *et al.* *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. 5, p. 2183-2187, 2005.

ŠVEC, P. *et al.* *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1567-1574, 2001.

TILLOTSON, G. S. An evaluation of the API-20 STREP system. **Journal of Clinical Pathology**. v. 35, n. 4, p. 468-472, 1982.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. *et al.* Molecular Epidemiology and Antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 197-205, 2004.

TORRES RODRÍGUEZ, M. T. *et al.* Factores de virulencia presentes en estirpes bacterianas del género *Enterococcus* aisladas en el litoral de Fortaleza. **Higiene y Sanidad Ambiental**. 20 (4): 1915-1922, 2020.

TORRES RODRÍGUEZ, M.T. *et al.* Presence of Pseudomonas and Enterococcus in stormwater drain systems and in the adjacent marine water, at Fortaleza city, Ceará State. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 48, n 1, p. 49 – 56, 2015.

TYRRELL, G. *et al.* *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. Isolated from Human Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v.40, n.4, p. 1140-1145, 2002.

USEPA - US.ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Recreational Water Quality Criteria**, Office of Water 820/F/12/058. US. Environmental Protection Agency. Washington, DC, 2012. 69 p.

VALENZUELA, A. S. *et al.* Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2648-2652, 2008.

VAN HORN, K. G.; GEDRIS, C. A.; RODNEY, K. M. Selective Isolation of Vancomycin-Resistant Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 924-927, 1996.

WADE T. J. *et al.* Rapidly measured indicators of recreational water quality and swimming-associated illness at marine beaches: a prospective cohort study. **Environmental Health**, v.9, n.66 p.1-14, 2010.

WADE, T. J. *et al.* Rapidly Measured Indicators of Recreational Water Quality Are Predictive of Swimming-Associated Gastrointestinal Illness. **Environmental Health Perspectives**. Detroit, v.114, n.1, p. 24-28, 2006.

WADE, T. J. *et al.* Do US Environmental Protection Agency water quality guidelines for recreational waters prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. **Environmental health perspectives**, v. 111, n. 8, p. 1102-1109, 2003.

WEBER, S. G.; GOLD, H. S. *Enterococcus*: an emerging pathogen in hospitals. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v. 24, n. 1, p. 49-60, 2003.

WHEELER, A. L. *et al.* Potential of *Enterococcus faecalis* as a Human fecal Indicator for Microbial Source Tracking. **Journal of environmental quality**, v. 31, p. 1286 – 1293, 2002.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Addendum to the WHO **guidelines for safe recreational water environments. Coastal and fresh waters: list of agreed updates.**, v. 1,

149p., 2009.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for safe recreational water environments: Swimming pools and similar environments**, Geneva, v.2, 146p., 2006.