

**EFEITO DA RADIAÇÃO SOLAR E DA SALINIDADE
SOBRE O CRESCIMENTO DE *Escherichia coli***

Hilda Maria Pinheiro de Castro

Fortaleza

Fevereiro/2003

RESUMO

A água do mar tem efeito tóxico sobre o crescimento de bactérias entéricas dentre as quais se incluem a *Escherichia coli*, reconhecida como indicador microbiológico de poluição fecal . Dentre os fatores que afetam a sobrevivência da bactéria em meio marinho encontram-se a radiação solar, salinidade, pH, falta de nutrientes e temperatura. O objetivo desse trabalho foi testar o efeito da radiação solar e salinidade sobre a sobrevivência de *E. coli*. De uma amostra de água coletada na saída da galeria pluvial em frente à Praia do Mucuripe, procedeu-se o isolamento e a identificação bioquímica de *E.coli*. Dez frascos transparentes e 10 frascos de cor âmbar, esterilizados, contendo 9 mL de água do mar com salinidade variando de 33 a 35 ‰, e pH entre 7,23 a 7,56, foram inoculados com 1mL da cultura crescida em TSA e diluída em solução salina estéril, de forma que a turbidez correspondesse ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Os frascos foram então submetidos a 10 dias de exposição à luz solar tendo como controle o mesmo tratamento em ausência de luz. Foram realizados dez experimentos. A sobrevivência da bactéria foi avaliada segundo o teste da Contagem Padrão em Placas (CCP) partindo-se do tempo T0 (inóculo inicial) prosseguindo até o T216 (em horas). Os resultados obtidos mostraram que para o cultivo exposto à luz solar, em dias nublados ou chuvosos, a cepa apresentou contagem em placas até o tempo T216, e em dias de maior incidência solar houve um decréscimo acentuado, com tendências sempre à queda da população. Para o controle, durante o mesmo período, não houve decréscimo significativo. O teste de Análise de Variância (ANOVA) mostrou que há uma correlação entre o tempo de exposição da cepa à radiação solar e a diminuição do número de células de *E.coli*.

Palavras-chaves: Indicador microbiológico, *Escherichia coli*, radiação solar, salinidade, culturabilidade.

ABSTRACT

Marine waters have a toxic effect over enteric bacteria, including *Escherichia coli* which is widely recognized as a microbiological indicator for fecal pollution. Several factors, such as solar radiation, salinity, pH, temperature and nutrients shortage, affect the survival of this bacterium in the marine environment. This work is aimed to study the effect of solar radiation and salinity on the survival of *E. coli*. An *E.coli* strain was isolated from a water sample taken from the outfall of a pluvial gallery, in front of the Mucuripe beach, and biochemically identified. Ten sterile transparent flasks and ten sterile amber flasks, each one containing 9 mL of marine water with salinity between 33 and 35‰ and pH between 7.23 and 7.56, were inoculated with 1 mL of the TSA-grown culture, and diluted with sterile saline until the tube reached a turbidity of 0.5 in the McFarland scale. The flasks were then subjected to 10 days of exposure to solar light, running simultaneously a control experiment following the same treatment conditions in the dark. 10 repetitions of the experiment were performed. The bacterial survival was evaluated by the Standard Plate Count assay (SPC), starting with $t = 0$ (the initial inoculation) and until $t = 216$ hours. The results showed a plate count every cloudy or rainy day of solar exposure, while in days of strong solar irradiation a significant decrease of the bacterial population was observed. During the same periods, the controls showed no significant decrease. The variance analysis (ANOVA) used to process the obtained data showed a correlation between the time of exposure to solar radiation and the decrease of *E. coli* cells.

Key-words: Microbiological indicator; *Escherichia coli*; solar radiation; salinity; survival.

1 INTRODUÇÃO

Conceitos como meio ambiente, poluição, qualidade de vida, impacto ambiental, passaram a ser incorporados ao cotidiano do povo brasileiro. Com efeito, se até há pouco tempo a preocupação com o equilíbrio ecológico era algo restrito a uma elite intelectual, hoje, problemas de tal ordem já incomodam o homem comum que começa a vislumbrar nas ameaças ambientais uma afronta à sua qualidade de vida e em muitos casos, à sua própria sobrevivência.

A poluição das praias do município de Fortaleza foi relatada por vários autores (Caland-Noronha & Morais 1972; Melo *et al.* 1990; Vieira & Façanha 1994; Melo *et al.* 1997; Vieira *et al.* 1999). Esses trabalhos tiveram por base o monitoramento de indicadores microbiológicos de poluição, tais como os coliformes fecais (termotolerantes) e mais especificamente a detecção de *Escherichia coli* presente em águas recreacionais. Esta é uma bactéria de origem estritamente fecal, cujo *habitat* é o homem e/ou animais de sangue quente e chega ao mar carregada por esgotos e efluentes, rios, riachos, córregos e galerias pluviais.

Caland-Noronha & Morais (1972) analisaram a poluição das praias de Fortaleza e constataram que a poluição decorria principalmente de esgotos sanitários e industriais, uma vez que as amostras de água coletadas em pontos mais distantes da costa apresentaram índice de coliformes fecais mais baixos.

Melo *et al.* (1990) estudando a poluição orgânica no estuário do rio Ceará constataram a presença de *E. coli* tanto nas águas quanto nos sedimentos analisados.

Melo *et al.* (1997) isolaram coliformes e *Salmonella* na água do mar coletada em praias de Fortaleza situadas no trecho entre o rio Cocó e o rio Ceará.

A descarga de esgotos em águas litorâneas e a sobrevivência de organismos patógenos ao homem têm conseqüências sobre a saúde pública. Desse modo, é necessário um conhecimento completo dos fatores que influenciam a sobrevivência das bactérias no ambiente marinho (Gourmelon *et al.*, 1997).

Davies & Evison (1991) citam vários fatores, tais como sedimentação, predação, exposição à luz solar, temperatura, salinidade e deficiência de nutrientes como causas na diminuição do número de bactérias de origem fecal presentes em águas ambientais. Apontam

também a salinidade como sendo um importante fator influenciando a culturabilidade das bactérias expostas à luz solar.

De acordo com Gourmelon *et al.* (1994), as enterobactérias lançadas ao mar são responsáveis por várias doenças, razão por que têm sido analisados diferentes fatores capazes de reduzir o número de *Escherichia coli* em ambientes marinhos, incluindo pH, salinidade, deficiência de nutrientes, competição com outras bactérias, temperatura, efeitos antibióticos da água do mar, predação e radiação solar.

Xu *et al.* (1982) ressaltam que quando um grupo de bactérias, tais como os coliformes fecais (termotolerantes), é usado como um indicador biológico de poluição e interessa à saúde pública pela detecção de outros patógenos, é imprescindível que se conheça mais sobre a sobrevivência desses organismos indicadores no meio ambiente.

O objetivo da presente pesquisa foi analisar a influência da radiação solar e salinidade sobre a sobrevivência da *E. coli* estocada em água do mar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O HOMEM E O AMBIENTE

As relações do homem com a natureza são tão antigas quanto a própria humanidade. Inicialmente foram pacíficas e harmônicas, já que o homem pré-histórico se alimentava de vegetais, caça e pesca, sem exploração e sem depredação.

De acordo com Lima (1979), o homem existe devido a um meio ambiente no qual evoluiu e que o sustentou até os dias de hoje. Esse meio ambiente necessitou de milhões de anos de evolução para atingir um grau de complexidade e de especialização que permitisse o aparecimento da espécie humana.

O conhecimento empírico das exigências ecológicas dos seres vivos já existia no homem pré-histórico, que o tinha adquirido durante a procura de caça e das plantas comestíveis, assim como de abrigos onde existisse um microclima favorável (Dajoz, 1983). Todavia, considerando-se a idade do aparecimento do homem sobre o planeta Terra, a compreensão de que a existência da vida está intrinsecamente ligada com a natureza e de que forma a ação antrópica provoca alterações na mesma, é relativamente recente (Lima, 1979).

Com o passar do tempo as civilizações evoluíram e outras atividades foram surgindo, tais como a agricultura e a pecuária, causando alterações no ambiente natural, especialmente nas florestas, as quais exercem papel fundamental sobre a qualidade dos solos e a quantidade de água disponível para produção da matéria orgânica (Silva, 1996).

Lima (1979) afirma que as modificações introduzidas pelo homem na natureza, mesmo tendo auxiliado muito no que concerne às comodidades ambientais, vêm apresentando certos aspectos hostis, se levarmos em consideração a deterioração geral do ambiente e os efeitos nocivos decorrentes dessas transformações. Ameaças diretas à saúde humana são os aspectos mais patentes da deterioração do ambiente e, dessas ameaças frontais, as mais discutidas são os fenômenos comumente reunidos sob o tema “poluição”. A poluição está presente tanto na água, no solo e no ar, como nos alimentos, através de ações antrópicas.

Ao longo da história, as zonas costeiras ofereceram vantagens aos viajantes e colonizadores. Cerca de quarenta por cento da população mundial vive num raio de 100 km das linhas da costa. Associada à ocupação desses terrenos encontra-se uma crescente necessidade de

infra-estrutura e de facilidades recreacionais. O efeito cumulativo do crescimento em nome do desenvolvimento tem acarretado aos espaços de convivência humana uma taxa cada vez maior de comprometimento e degradação ambiental. O Brasil, com 7.408 km de costa, é o segundo país em extensão litorânea na América Latina, concentrando cerca de 70% da população em 75% dos principais centros urbanos dispostos ao longo do litoral. Constata-se que o crescimento populacional vem se fazendo de forma heterogênea, em termos espaciais. O aumento da proporção de habitantes nas cidades e em especial, nas grandes cidades e capitais faz a densidade da zona costeira crescer mais que a média nacional, acentuando a pressão sobre os seus recursos naturais (BRASIL, 1998).

As atividades humanas estão reduzindo a capacidade produtiva dos vários ambientes marinhos. Descargas fluviais e efluentes terrestres em geral contribuem com quantidades significativas de material, desde areia fina até produtos químicos tóxicos, para a zona costeira. Esta possui *habitats* diversos e produtivos, importantes para os estabelecimentos humanos, para o desenvolvimento e subsistência das populações locais. Basta observarmos um mapa dos continentes, para percebermos que mais da metade dos países encontram-se banhados por oceanos ou mares e que a população mundial vive num raio de 60 quilômetros do litoral. Muitos dentre os pobres do mundo vivem aglomerados nas zonas costeiras, cujos recursos são vitais para muitas comunidades (Jeffrey, 1995).

Segundo Mota (1988), o meio urbano dá origem a várias impurezas, tais como, poluentes atmosféricos carreados pela chuva, poeira e lixo, erosão do solo, uso de defensivos e fertilizantes em jardins, além de ligações clandestinas de esgotos às galerias pluviais, que favorecem a presença de microrganismos patógenos.

O sistema de galeria pluviais destina-se a dar pronto escoamento a água de chuva que cai nas vias públicas ou a que a elas chegam através dos coletores prediais. A qualidade dessas águas depende da limpeza urbana e de sua freqüência, da intensidade, da precipitação e da distribuição temporal e espacial, época do ano e do tipo de uso de área urbana. Portanto, estas águas não deveriam estar contaminadas com material fecal, nem conectadas a nenhum sistema de esgoto (Mota & Tucci, 1994).

As cidades litorâneas se distinguem das comunidades interioranas pelo fato de contar com um corpo d'água receptor salgado e incomensurável, mas finito. A disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos é uma alternativa atraente para cidades litorâneas de

médio e grande porte, em todo o mundo. A alta taxa de diluição que pode ser alcançada na descarga no mar, é uma característica marcante a ser considerada em projetos. Algumas cidades das Américas utilizam este processo, devendo o seu uso ser incentivado, logicamente dependendo das condições locais de cada cidade e após ser muito bem avaliado o impacto ambiental. De todos os parâmetros considerados para avaliação do desempenho do emissário submarino de esgotos, a densidade de coliformes fecais é a que apresenta maior significado relacionado às condições sanitárias do corpo receptor (Berzin, 1991).

Ludwig (1973) confirma que para a determinação do comprimento dos lançamentos submarinos é primordial a comprovação da taxa de densidade de organismos coliformes nas águas litorâneas.

O levantamento das condições gerais de saneamento em cada município deve ser premente e compreender os sistemas de abastecimento de águas e esgotos (Figueirôa *et al.*, 1999).

As águas de praia contaminadas pelas descargas de esgotos domésticos podem representar um risco à saúde dos banhistas e freqüentadores desses ambientes de lazer, sendo as crianças e os idosos, ou pessoas com baixa resistência as mais susceptíveis à exposição a bactérias, vírus e protozoários, sendo que a balneabilidade dessas áreas é determinada principalmente pelas condições microbiológicas das águas (CETESB, 1998).

O papel dos microrganismos como indicadores biológicos para definir a qualidade da água abrange basicamente três aspectos: 1) identificar variações no ambiente; 2) quantificar níveis de poluição; 3) ser usados em laboratórios para o estudo, sob condições controladas, de fenômenos possivelmente extrapoláveis para o meio ambiente (Santos, 1980). Segundo o autor, analisar todos os microrganismos veiculados pela água e associados à transmissão de doenças à população é inviável tanto em termos de tempo quanto pelo alto custo envolvido. Por esta razão é uma prática comum monitorar bactérias, normalmente não patogênicas, presentes em alta densidade nas fezes humanas e de animais. A presença de altas concentrações dessas bactérias no meio aquático indica a existência de contaminação fecal e a possível presença de patógenos entéricos.

Indicadores tradicionais de contaminação fecal de águas naturais são usados, segundo Hagler *et al.* (1986), para monitorar a poluição fecal recente em águas marinhas. Os padrões

usados em águas recreacionais de contato primário em várias cidades são baseados na contagem de coliformes fecais.

De acordo com Capra (1996), defrontamo-nos com toda uma série de problemas globais que estão danificando a biosfera e a vida humana de uma maneira alarmante, e que pode logo se tornar irreversível. Segundo o autor, há soluções para os principais problemas de nosso tempo, algumas delas até mesmo simples. Mas requerem uma mudança radical em nossas percepções, no nosso pensamento e nos nossos valores. E, de fato, estamos agora no princípio dessa mudança fundamental de visão do mundo na ciência e na sociedade, uma mudança de paradigma tão radical como o foi a revolução copernicana. Essa compreensão não despontou ainda entre a maioria de nossos líderes políticos. O reconhecimento de que é necessária uma profunda mudança de percepção e de pensamento para garantir a nossa sobrevivência ainda não atingiu a maioria dos líderes das nossas corporações, nem os administradores nem os professores das nossas grandes universidades.

2.2 LEGISLAÇÃO

No Brasil, somente após a promulgação da Constituição Federal de 1988, instaurou-se um quadro extremamente progressista onde a variável ambiental passou a ser incluída e questionada em todos os setores da vida nacional.

A Constituição Federal, em seu artigo 225, capítulo VI diz que:

“Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.”

E no § 4º do mesmo artigo,

*“A Floresta Amazônica brasileira, a Mata Atlântica, A Serra do Mar, o Pantanal Mato-Grossense e a **Zona Costeira** são patrimônio nacional, e sua utilização far-se-á, na forma da lei, dentro de condições que assegurem a preservação do meio ambiente, inclusive quanto ao uso de recursos naturais.”*

A Lei de Crimes Ambientais, Lei nº 9.605 de 12 de fevereiro de 1998, que dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de conduta e atividades lesivas ao meio ambiente,

(BRASIL, 2000), em seu capítulo V, seção III, trata da poluição e outros crimes ambientais, e em seu Art. 54 diz:

“Causar poluição de qualquer natureza em níveis tais que resultem ou possam resultar em danos à saúde humana, ou que provoquem a mortalidade de animais ou a destruição significativa da flora, é passível de pena de reclusão de um a quatro anos, com multa”.

E no seu parágrafo 2º, inciso III, IV, V e VI respectivamente:

- *causar poluição hídrica que torne necessária a interrupção do abastecimento público de água de uma comunidade;*
- *dificultar ou impedir o uso público das praias;*
- *lançar resíduos sólidos, líquidos ou gasosos ou detritos, óleos ou substâncias oleosas em desacordo com as exigências estabelecidas em leis e regulamentos; e*
- *deixar de adotar, quando assim o exigir a autoridade competente, medidas de precaução em caso de risco de dano ambiental grave ou irreversível.*

Crimes esses passíveis de pena de reclusão de um a cinco anos.

A Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar (CNUDM, 1998) em seu artigo número um (1) diz que :

“a poluição marinha significa a introdução pelo homem, direta ou indiretamente, de substâncias ou de energia no meio marinho, incluindo os estuários, sempre que a mesma provoque ou possa vir a provocar efeitos nocivos, tais como danos aos recursos vivos e à vida marinha, riscos à saúde do homem, entrave às atividades marítimas, incluindo a pesca e as outras utilizações legítimas do mar, alteração da qualidade da água do mar, no que se refere à sua utilização, e deterioração dos locais de recreio”.

Essa qualidade da água do mar é alvo das preocupações do CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, que por meio da resolução nº 274/00 instituiu os limites de poluição por coliformes fecais, *E.coli* e enterococos para que a balneabilidade, ou qualidade das águas recreacionais, seja declarada, por categorias, de EXCELENTE a IMPRÓPRIA (quadro 1).

De acordo com essa resolução, as águas marinhas são consideradas IMPRÓPRIAS quando em 80% de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores houver mais de 1.000 coliformes fecais (ou termotolerantes) ou 800 *Escherichia coli* ou 100 enterococos/100 mL.

Quadro 1 – Balneabilidade segundo Resolução 274 (CONAMA, 2000)

CATEGORIAS DE BALNEABILIDADE		LIMITE DE COLIFORMES FECAIS, <i>Escherichia coli</i> e ENTEROCOCOS (NMP/100 ML)
PRÓPRIAS	EXCELENTE	➤ Quando em um total de 80% ou mais de um conjunto de 5 amostras, colhidas num mesmo local, em 5 semanas anteriores, houver no máximo, 250 coliformes fecais ou 200 <i>Escherichia coli</i> ou 25 enterococos por 100 mililitros.
	MUITO BOA	➤ Quando em um total de 80% ou mais de um conjunto de 5 amostras, colhidas num mesmo local, em 5 semanas anteriores, houver no máximo, 500 coliformes fecais ou 400 <i>Escherichia coli</i> ou 50 enterococos por 100 mililitros.
	SATISFATÓRIA	➤ Quando em um total de 80% ou mais de um conjunto de 5 amostras, colhidas num mesmo local, em 5 semanas anteriores, houver no máximo, 1000 coliformes fecais ou 800 <i>Escherichia coli</i> ou 100 enterococos por 100 mililitros.
IMPRÓPRIAS	IMPRÓPRIA	<ul style="list-style-type: none"> ➤ O não enquadramento em nenhuma das categorias anteriores, por terem ultrapassado os índices bacteriológicos nelas admitidos ou quando o valor obtido na última amostragem for superior a 2500 coliformes fecais ou 2000 <i>Escherichia coli</i> ou 400 enterococos por 100 mililitros. ➤ Quando houver floração de algas ou outros organismos, até que se comprove que não ofereçam riscos à saúde humana. ➤ Quando houver incidência elevada ou anormal, na região, de enfermidades transmissíveis por via hídrica, indicada pelas autoridades sanitárias. ➤ Quando houver presença de resíduos ou despejos, sólidos ou líquidos, inclusive esgotos sanitários, óleos, graxas e outras substâncias, capazes de oferecer riscos à saúde ou tornar desagradável a recreação.

Fonte: Resolução CONAMA 274/00

2.3 COLIFORMES

Dentre os indicadores microbiológicos de poluição fecal, o grupo coliforme é o mais empregado. A característica é sua forma bastoneteiforme, Gram negativo, não esporulado e fermentador da lactose com formação de gás a 35°C. Estão incluídos nesse grupo muitas bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. Descobertas mais recentes permitem aplicar à caracterização do grupo, a pesquisa das enzimas citocromo oxidase (negativa) e a β -galactosidase (positiva) (Toranzos & McFeters, 1997).

Essas bactérias são típicas da microbiota fecal, mas também podem ser isoladas de outros locais com exceção da *E.coli* cuja origem é estritamente fecal (Hagler & Hagler 1988), não se multiplicando com facilidade no ambiente externo e com sobrevivência similar à das bactérias patógenas (CETESB, 1978).

Algumas bactérias do grupo coliforme são encontradas no solo e em vegetais, e têm a capacidade de se multiplicar na água com relativa facilidade (Vieira *et al.*, 1999).

Segundo Lebaron *et al.* (1994) o dado importante em relação a presença, em grande quantidade, de coliformes fecais (CF) numa coleção d'água, mesmo em águas estuarinas ou marinhas, é que a *E.coli*, maior representante dos coliformes fecais, é capaz de conjugar em meio salino, podendo em alguns casos transferir plasmídeos resistentes a metais pesados e diferentes antibióticos à população autóctone.

2.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é o nome aceito para o bacilo coliforme, originalmente denominado *Bacillus coli commune* por Theodor Von Escherich em 1885, *Baccilus coli* por Migula em 1895 e *Bacterium coli* por Lehmann em 1896. Atualmente apresenta grande significado clínico para o homem devido ao seu papel como patógeno oportunista, causando infecções no sangue, feridas e trato urinário, sendo, ao lado de outras enterobactérias, virtualmente considerado causador de qualquer doença infecciosa e podendo ser potencialmente isolado de qualquer amostra enviada ao laboratório em caso de pacientes hospitalizados e imunodepressivos (Konemam *et al.*, 1993).

Segundo Dias *et al.* (1994), a *E. coli* da microbiota do intestino humano pode contaminar, colonizar e subseqüentemente causar infecções extra-intestinais, sendo um dos principais agentes etiológicos de septicemias, meningites e infecções do trato urinário.

A *E.coli*, membro da família Enterobacteriaceae, apresenta colônias relativamente grandes, cinza-escuras úmidas ou mucóide (Konemam *et al.*, 1993) e caracteriza-se pela presença das enzimas β -galactosidase e β -glicuronidase. Cresce em meio complexo a 44 -45°C, fermenta lactose e manitol com produção de ácido e gás e produz indol a partir do aminoácido triptofano (CONAMA, 2000).

O habitat natural da *E. coli* é o trato intestinal dos animais de sangue quente, incluindo o homem. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de $36 \pm 1^\circ\text{C}$. É oxidase negativa, podendo usar o acetato como única fonte de carbono, o mesmo não acontecendo com o citrato, o qual não pode ser utilizado pela bactéria. A glicose e outros carboidratos são fermentados com produção de piruvato, que é então convertido a ácido láctico, acético e fórmico. Muitas cepas, especialmente aquelas isoladas dos tecidos extra-intestinais, possuem cápsulas ou microcápsulas polissacarídias (Brenner, 1984).

Segundo Brenner (1984), a maioria das cepas de *E.coli* possui tanto o “pêlo sexual” (pili) quanto fímbrias freqüentemente dispostas em grande número na superfície bacteriana. Algumas dessas fímbrias possuem funções específicas, desempenhando o papel de órgãos adesivos. Suas duas variedades são descritas baseadas na habilidade de hemoaglutinação.

2.3.1.1 Patogenicidade

Quanto à patogenicidade, a *E. coli* normalmente não causa doenças ao ser humano, entretanto quando este está debilitado ou imunologicamente deprimido e quando as barreiras gastro-intestinais são violadas as cepas de *E. coli* podem causar infecções, que vão desde a diarreia até septicemia ou meningite além de infecções urinárias (Nataro & Kaper, 1998).

A *E.coli* compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, os antígenos O, K (bainha ou capsular) e H (flagelar). São conhecidos atualmente 174 antígenos O, 100 antígenos K e 57 antígenos H (Campos & Trabulsi, 1999).

Certos sorogrupos O de *E. coli* são conhecidos por invadir a mucosa intestinal, produzindo uma síndrome semelhante àquela causada por espécies de *Shigella* (Konemam *et al.*, 1993; Mahon & Manuselis, 1995).

Segundo Nataro & Kaper (1998), essa bactéria foi dividida em seis grupos baseados em fatores definidos de virulência, manifestações clínicas produzidas, epidemiologia e sorotipagem. Os grupos que são reconhecidos como causadores de diarreias são: *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC) também referida como *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), e *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC). Existem vários outros grupos de *E. coli* diarreagênica, incluindo *E. coli* Enteroagregativa (EaggEC) e difusamente agregada (DAEC) sendo que ainda existem várias outras cepas de *E. coli* produtoras de toxinas, mas o significado clínico destes organismos não é claro.

2.3.1.2 Fatores capazes de atuar sobre a viabilidade da *E.coli*

As condições do ambiente marinho dificultam o isolamento de bactérias patogênicas. Isso explica porque as pesquisas sobre a contaminação microbiana do litoral se limitam geralmente à determinação das concentrações de bactérias indicadoras de poluição fecal. Por ser uma bactéria de origem fecal, a *E.coli* é um dos patógenos que apresenta maior importância em estudos, quando se deseja constatar contaminação por esgotos. Mas, à imitação das demais bactérias, precisa de condições favoráveis para se desenvolver (CETESB, 1998).

A dinâmica da sobrevivência é especialmente importante na avaliação da água clorada e da água do mar. Para a maioria das bactérias entéricas, a água do mar é tóxica (Hagler & Hagler, 1998). De acordo com os autores supra citados, a *E.coli* exibe pouca tolerância à toxicidade da água do mar e aos procedimentos de cloração quando comparada com outros patógenos mais resistentes. Assim sua presença implica em despejo contínuo de dejetos na área analisada.

Segundo estudos realizados por Melo *et al.* (1990), existe uma inter-relação entre os fatores físicos e químicos da água e dos sedimentos, os quais estão sempre agindo, isolados ou conjuntamente, sobre o número total de bactérias nas águas superficiais.

Quando as bactérias entéricas são lançadas no meio ambiente costeiro, seu destino depende de vários processos, dirigindo-se tanto para seu desaparecimento como para uma alteração em seu estado fisiológico (Trousselier *et al.*, 1998) (figura 1).

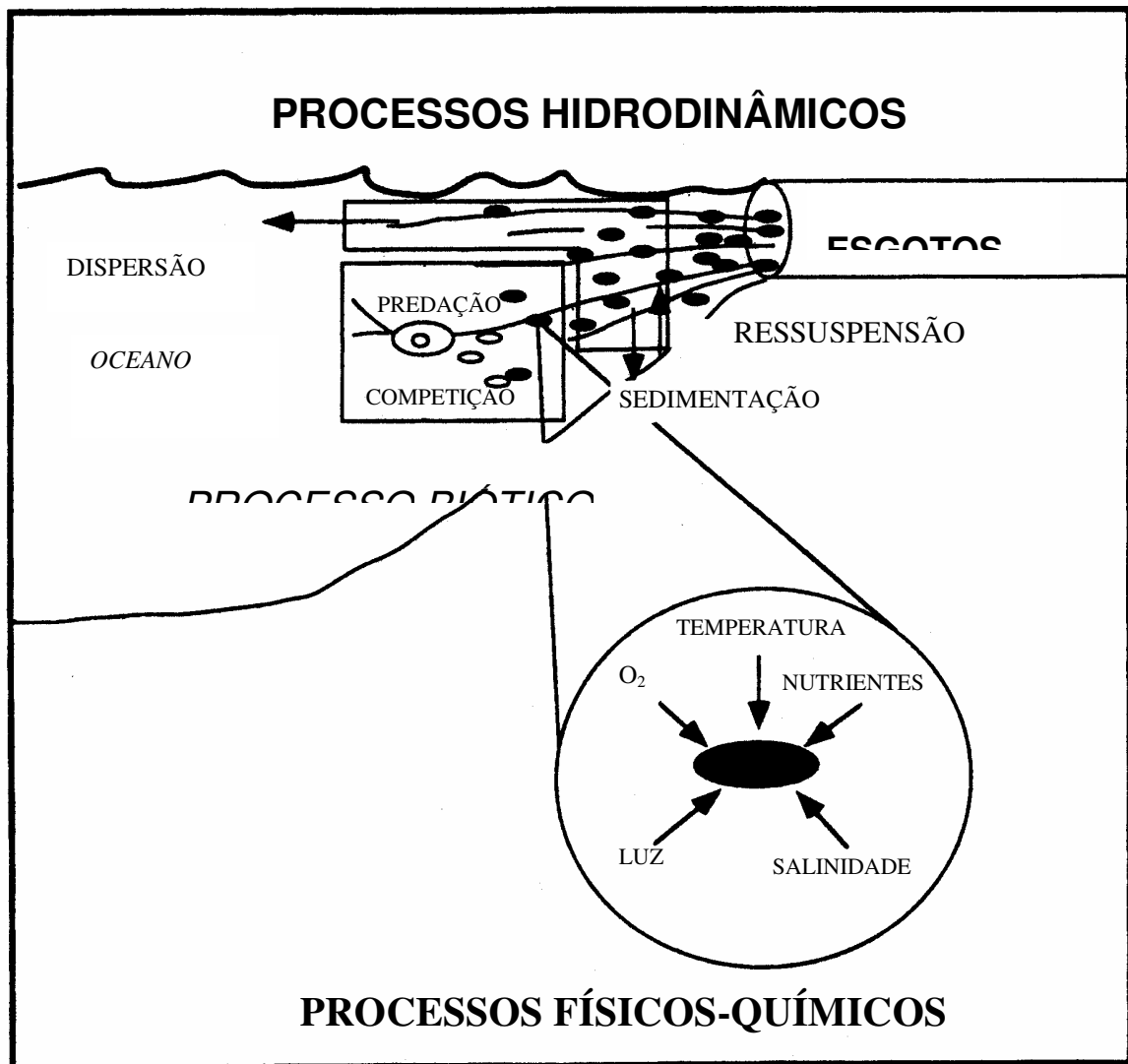


Figura 1 - Fatores interferentes na viabilidade de *Escherichia coli* em meio marinho.

Fonte: Trousselier *et al.*, (1998).

Ainda segundo Trousselier *et al.* (1998), comparado com o trato digestivo, o ambiente marinho caracteriza-se por baixas temperaturas (a temperatura ótima de crescimento para coliformes fecais fica em torno de 37°C), altas salinidades (35 a 38‰), presença da radiação solar

na superfície das águas (UV-A, UV-B, luz solar visível), taxa de oxigênio elevada, presença de bactérias autóctones competitivas no que se refere a nutrientes, além da predação por organismos planctônicos tais como nanoplâncton.

2.3.1.2.1 Radiação solar

Dentre os vários estresses aos quais as enterobactérias são submetidas quando lançadas em águas marinhas, a radiação solar parece ser o mais importante na redução do número de coliformes (Barcina *et al.*, 1990; Davies & Evison 1991; Alkan *et al.*, 1995; Pommepuy *et al.*, 1996; Gourmelon *et al.*, 1994 e 1997).

Gourmelon *et al.* (1994) afirmam que o efeito tóxico da luz visível sobre *E.coli* em meio marinho é expressa por uma rápida diminuição da habilidade de formar colônias, a viabilidade não sendo, entretanto, significativamente reduzida.

Segundo Davies & Evison (1991), tanto a U.V. como os componentes visíveis da luz solar são letais para bactérias em água do mar, sendo que a luz UV usualmente interfere no DNA causando danos mais severos.

Gourmelon *et al.* (1997) observaram que a luz visível parece aumentar seu efeito com o aumento da salinidade na água e concluíram que isso não é apenas um simples efeito aditivo mas também um efeito sinérgico. Diferentes hipóteses podem ser consideradas para explicar o efeito sinérgico da salinidade e da radiação solar. Compostos tóxicos formados durante a exposição à luz podem alterar a resposta celular ao estresse osmótico, tal como a síntese ou transportes de solutos compatíveis, por alteração de proteínas biosintéticas ou da membrana. Reciprocamente, as trocas intercelulares induzidas sob estresse osmótico podem alterar a defesa das células ao lutarem contra a luz visível ou podem aumentar os danos da radiação solar por incremento de sensibilização endógena.

2.3.1.2.2 Salinidade

Os microrganismos, quando não são de origem marinha, possuem um grau de tonicidade intracelular equivalente aquele produzido por uma solução salina de 0,85-0,90 % (Jay, 1986).

Quando as células são suspensas em solução salina, estabelece-se uma isotonicidade, ou seja, a água circula através da membrana, igualmente em ambos os sentidos. No entanto, quando as mesmas células são suspensas em soluções salinas de maior concentração, o teor de água livre é maior no interior da célula do que no ambiente externo, que passa a ser hipertônico, resultando na remoção de água do interior com conseqüente plasmólise e danos ou morte da célula (Leitão, 1998).

A presença do sal exerce também outros efeitos deletérios sobre os microrganismos. Segundo Frazier & Westhoff (1988), entre estes efeitos destacam-se a ionização em solução, liberando o íon Cl, tóxico aos microrganismos, a redução da solubilidade do oxigênio as soluções, sensibilização das células ao CO₂ e interferência na atividade de enzimas proteolíticas. Ainda segundo os autores, a ação do NaCl varia diretamente com suas concentrações e com a temperatura.

Em relação ao comportamento frente ao NaCl, Baross (1976) divide os microrganismos nos seguintes grupos:

1. Ligeiramente halófilos crescendo otimamente em meios contendo 2-5% de NaCl e incluindo microrganismos marinhos, principalmente os gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium*.
2. Moderadamente halófilos, crescendo principalmente em meios contendo 5 a 20% de sal e incluindo bactérias Gram positivas das famílias *Bacillaceae* e *Micrococaceae*.
3. Extremamente halófilos, crescendo em meios contendo 20 a 30% de sal, tendo como principais representantes as bactérias halófilas estritas, dos gêneros *Halobacterium* e *Halococcus*.

Gourmelon *et al.* (1997) confirmam que a água do mar com sua alta osmolaridade e limitação de nutrientes é um ambiente hostil para bactérias tais como *E. coli*.

De acordo com Carlucci & Pramer (1960) e Anderson *et al.* (1979), na água do mar a *E. coli* é submetida a uma alta pressão osmótica. Na ausência de uma adaptação ativa para o choque osmótico, o meio salino danifica as células. O choque osmótico é responsável por um fluxo de água para a célula o que, conseqüentemente, resulta numa redução da pressão de turgência e numa retração (diminuição) do volume do citoplasma.

Segundo Davies & Evison (1991), o efeito da salinidade é entretanto mais significativo na presença da radiação Ultra-Violeta, donde concluíram que a salinidade parece ser um importante fator influenciando a culturabilidade em bactérias expostas à luz solar.

2.3.1.2.3 Temperatura

Para Roszak & Colwell (1987), temperaturas significativamente acima de 20° C são muitas vezes letais para bactérias aquáticas ou para microrganismos adaptados ao ambiente marinho, incluindo organismos de possível importância para a saúde pública.

Segundo Hagler *et al.* (1986), altas temperaturas da água e forte luz solar favorecem o declínio da sobrevivência de coliformes aumentando a probabilidade de patógenos estarem presentes.

Loosanoff & Davis (1963) concluíram que as temperaturas em torno de 30°C favorecem o crescimento de bactérias responsáveis pela mortalidade em massa de cultivos de moluscos bivalves, o que é confirmado por Miranda & Guzinski (1999) ao afirmarem que a contaminação por bactérias é provavelmente o maior problema que deve ser levado em consideração na larvicultura e que isso é favorecido pelas altas temperaturas.

2.3.1.2.4 pH

Os microrganismos de maneira geral são capazes de viver em diferentes valores de pH, no entanto, a maioria requer valores de pH em torno da neutralidade. Qualquer que seja o valor do pH do meio externo, o pH intracelular é mantido próximo à neutralidade. Uma das fortes indicações deste controle de pH é o fato de as proteínas enzimáticas ou não-enzimáticas serem mais ativas na faixa estreita de pH entre 6,8 e 7,2. A característica de apresentar atividade metabólica maior em valores extremos está restrita a apenas alguns grupos de bactérias (Barbosa & Torres 1999). Segundo os autores, as bactérias são divididas em três grupos quanto às faixas de valores de pH em que exibem maiores atividades metabólicas:

1. Acidófilas – pH entre 1,8 e 5,0
2. Neutrófilas – pH entre 5,0 e 9,0, faixa que compreende a maior parte das espécies conhecidas

3. Alcalófilas – pH entre 9,0 e 11,0.

Os coliformes se desenvolvem dentro de uma ampla faixa de pH que varia de 4,4 a 9,0. Sendo que *E. coli* pode crescer em um meio contendo apenas uma fonte de carbono orgânico tal como a glicose, e uma fonte de nitrogênio tal como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ (Jay, 1986).

2.3.1.3 Taxa de declínio ou decay-rate (T90)

Segundo Brisou (1955), partindo-se de um número de 10.000 coliformes por litro, no ponto de partida T₀, em 48 horas haveria uma queda teórica de 90%, só restando 1.000 coliformes os quais diminuiriam para a centena ou para zero no prazo de 3 ou 4 dias de testes. Segundo o autor é isso, inclusive, o que se constata no meio ambiente se a contaminação não é constantemente renovada. A afirmação é corroborada por Hagler & Hagler (1998), ao citarem que a população de *E. coli*, por exemplo, é 90% eliminada em poucas horas ou poucos minutos, dependendo de vários fatores ambientais. Portanto, pode-se constatar que a taxa de declínio da *E. coli* na água do mar é muito alta e, uma alta taxa, indica contaminação recente.

2.4 VIÁVEL MAS NÃO CULTIVÁVEL - (VBNC)

Os seres vivos são auto-organizadores, não só possuem a tendência de se manter em seu estado de equilíbrio dinâmico, como também revelam a tendência oposta, ainda que complementar, a de se transcenderem, ou de se estenderem criativamente para além de suas fronteiras e gerarem novas estruturas e novas formas de organização (Capra, 1988).

Como seres vivos, as populações bacterianas no meio ambiente são freqüentemente expostas ao estresse devido às limitações e trocas e nutrientes e outros fatores já citados acima. Dessa maneira, a persistência da bactéria no meio ambiente é em grande parte, determinada por sua habilidade para suportar esses estresses (McDougald *et al.*, 1998). Ainda segundo os autores, atualmente é aceito que algumas bactérias, quando submetidas a certos estresses ambientais, não são recuperáveis por técnicas normais de cultura. Tem sido proposto que a viabilidade pode ser mantida na ausência da culturabilidade e que o estágio de viável mas não cultivável pode ser análogo à respostas ao estresse tais como a formação de esporos.

Quando as enterobactérias são lançadas em águas marinhas, elas são imediatamente expostas ao estresse e entram em um estado de latência, descrito por Xu *et al.* (1982); Roszak & Colwell (1987); Davies & Evison (1991); Pommepuy *et al.* (1996); McDougald *et al.* (1998) e Ohtomo & Saito (2001), como um estado de viável mas não cultivável (VBNC).

Para McDougald *et al.* (1998), o estágio de VBNC pode ser uma resposta fisiológica geneticamente programada de algumas bactérias as quais precisam sobreviver durante o estresse a que estão submetidas no ambiente.

De acordo com Davies & Evison (1991), o fenômeno de viável mas não cultivável é uma estratégia de sobrevivência adotada por várias espécies de Gram-negativas em resposta a condições desfavoráveis do meio ambiente.

Xu *et al.* (1982) demonstraram a existência de um estágio de viável mas não cultivável em *E. coli*. Durante duas semanas de incubação em água salgada (5 a 25 ‰ NaCl), a contagem total de *E. coli*, medida por microscopia direta, usando Acridine Orange, permaneceu inalterada, enquanto que o NMP estimado e a contagem de placas exibiram rápido declínio.

3 MATERIAL E MÉTODOS:

O experimento constou de duas etapas:

3.1 ETAPA I: ISOLAMENTO DA *E.coli*

Foram coletados aproximadamente 500 mL de água, em garrafa de cor âmbar esterilizada, na saída da galeria pluvial, em frente à Praia do Mucuripe (figura2), a cerca de um (1m) metro de profundidade. A amostra foi coletada no período da manhã e transportada ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, onde foram realizadas as provas bacteriológicas para isolamento e identificação de cepas de *E.coli*.



Figura 2 – Local de coleta, saída da galeria pluvial para o mar.

O meio usado para detecção de *E. coli* foi o meio de Colilert – IDEXX, reidratado com água destilada esterilizada e distribuído em tubos também esterilizados (10mL em cada tubo). Os tubos, em triplicata, foram inoculados com as diluições (10^{-1} a 10^{-3}) da amostra em salina 0,85% esterilizada e incubados a 35°C/24h.

O resultado dessa prova para coliformes totais é visualizado através da coloração amarela nos tubos. A presença de *E.coli* é observada nos mesmos tubos expostos à lâmpada ultravioleta e, apresentam coloração azul fluorescente, devido a presença de 4-Metilumbeliferona, produto da degradação do ácido 4-Metilumbeliferil-β-D-Glicuronidase (MUG) utilizado como substrato para indicar a presença da enzima B- Glicuronidase produzida pela *E. coli*.

Dos tubos positivos para *E.coli* foram retirados inóculos e estriados em placas preparadas com Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB)- MERCK com ajuda de uma alça de níquel-cromo, as quais foram incubadas por 24 horas, a 37°C.

As colônias características de *E.coli*, isto é, com diâmetro de 2 a 5 mm, centro negro, com ou sem brilho metálico esverdeado, foram isoladas em tubos de ensaio contendo Ágar Triptose Soja (TSA) -MERCK, inclinado. Em média, foram isoladas duas colônias características de *E.coli* de cada placa positiva de EMB. Os tubos de TSA foram incubados em estufa a 37°C por 24 horas e após esse tempo, as cepas isoladas foram submetidas à identificação, através da classificação morfológica, fermentação em Caldo Lauril Sulfato (CLS) e de testes bioquímicos do IMVIC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato) (Mehlman *et al.*, 1984).

3.1.1 Classificação morfológica e bioquímica da cepa de *E.coli* isolada de galerias pluviais e utilizada no experimento

3.1.1.1 – Coloração de Gram (Bier, 1970)

Foram preparadas lâminas a partir do crescimento da cultura pura em TSA, utilizando-se o método da coloração de Gram, o qual se baseia no fato de que, quando certas bactérias são coradas pela violeta de genciana e depois tratadas pelo iôdo (solução iôdo-iodetada – “Lugol”) forma-se um composto de coloração escura entre o iôdo e o corante (iôdo-pararosanilina), o qual é fortemente retido pelas bactérias e não pode ser facilmente removido pelo tratamento subsequente com álcool, nem corado posteriormente pelo corante de fundo (fucsina). Estas

bactérias são conhecidas como Gram-positivas, enquanto aquelas conhecidas como Gram-negativas deixam-se descorar pelo álcool e aceitam o corante fucsina. A *E.coli* é um exemplo de bactéria bacilar, Gram negativa.

3.1.1.2 Fermentação em Caldo Lauril Sulfato (CLS) – DIFCO.

As cepas suspeitas foram inoculadas em tubos com Caldo Lauril Sulfato (CLS) e tubinhos de Durham invertidos. Os tubos foram incubados em estufa a 35°C, por 48 horas. A presença de turvação e o aparecimento de bolhas nos tubinhos de Durham confirmam a fermentação e a prova é considerada positiva para *E. coli*.

3.1.1.3 Testes bioquímicos (Mehlman *et al.*, 1984).

As cepas suspeitas de serem *E. coli* foram testadas bioquimicamente através dos seguintes testes:

Teste do Indol

Um inóculo retirado do meio de TSA foi adicionado à 3 mL do meio SIM -VETEC, com a ajuda de uma agulha de níquel - cromo, e em seguida incubado a 35°C, por 48 horas. A visualização do resultado foi feita com a adição de 0,2 mL do reativo de Kovacs (paradimetilaminobenzaldeído) ao meio. O aparecimento de um anel róseo na superfície do meio indica prova positiva caracterizando a produção de Indol, oriundo da degradação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase .

Teste do Vermelho de Metila (VM)

Neste teste foi utilizado 3mL do Caldo MR-VP -VETEC inoculado com as cepas contidas no TSA e incubado por 96 horas, a 35°C. Após este tempo, de maneira asséptica, foram adicionados 3 a 5 gotas de solução de vermelho de metila, no interior do caldo. O surgimento de uma coloração vermelha indica a positividade do teste VM para *E. coli*. Esse fato é devido a alta

concentração de ácido produzido pelas bactérias coliformes que utilizam a fermentação ácido mista no seu metabolismo. Os produtos formados no final dessa fermentação são responsáveis pela acidez no meio, sendo $<$ que 4.5, o ponto de viragem do indicador Vermelho de Metila.

Teste de Voges-Proskauer (VP)

Um tubo contendo 3 mL de Caldo MR-VP -VETEC foi inoculado com as cepas teste contida no TSA e incubado por 48 horas a 35°C. Para cada 1,0 mL do meio foram adicionados 0,6 mL do reativo de Barrit I (α - naftol) e 0,2 mL do reativo Barrit II (KOH a 40%). O tubo foi agitado vigorosamente, aberto e deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. O aparecimento de coloração rósea, começando na superfície, indica teste de VP positivo mostrando presença de acetoína (acetil metil carbinol), que em meio alcalino e em aerobiose é oxidado formando diacetil, o qual em presença de KOH e α - naftol apresenta coloração vermelha. A ausência de cor vermelha indica VP negativo, característica da *E. coli*.

Teste do Citrato

Um inóculo do meio de TSA foi utilizado para estriar tubos com meio Ágar Citrato de Simmons- DIFCO inclinado, utilizando-se alça de níquel-cromo. Os tubos foram incubados a 35°C por 96 horas. A presença de crescimento, com posterior viragem do indicador (azul de bromotimol), presente no meio, indica prova positiva. A viragem do azul de bromotimol prova que o meio está alcalino com a presença de microrganismos que utilizam o citrato como única fonte de carbono. Esta prova é negativa para *E. coli*.

3.2 ETAPA II – PREPARO DOS INÓCULOS DE *E.coli* EM ÁGUA DO MAR

3.2.1 Preparação da água do mar

A água do mar foi coletada na Praia do Meireles e, em laboratório, foram medidos os valores de pH e salinidade. Os valores de pH foram obtidos usando-se um potenciômetro marca MICRONAL enquanto que os valores de salinidade foram obtidos pelo uso do salinômetro marca

ATAGO com precisão de 1‰. Todas as amostras de água do mar foram esterilizadas por autoclavação a 121°C por 15 minutos e em seguida submetidas à prova de esterilidade em placas de Petri contendo Agar Plate Count (PCA)-OXOID.

3.2.2 Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo inicial foram retiradas alçadas do crescimento puro da bactéria em ágar TSA com alça de níquel-cromo e introduzida em solução salina a 0,85% até atingir a turbidez equivalente à concentração 0,5 da escala de McFarland.

3.2.3 Experimento

3.2.3.1 Inoculação da água do mar

Do inóculo inicial foram retirados assepticamente alíquotas de 1,0 mL que foram adicionadas em frascos de vidro contendo 9,0 mL de água do mar esterilizada. Os frascos com capacidade total de 60 mL tinham tampas rosqueáveis, sendo 10 transparentes e 10 de cor âmbar.

Após a introdução do inóculo, os frascos foram fechados e vedados com filme PVC para evitar evaporação. Os transparentes foram expostos à luminosidade solar direta, em ambiente externo ao laboratório, enquanto que os de cor âmbar foram mantidos em sala escura, à temperatura de ambiente do laboratório (28,0°C ± 2,0°C).

3.2.3.2 Contagem Padrão em Placas (CPP) das colônias de *E. coli*

A primeira contagem teve início logo após o inóculo, no tempo chamado de T₀. Foi selecionado ao acaso um frasco. Do mesmo, foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e usando-se pipetas estéreis foram preparadas diluições decimais de 10⁻² a 10⁻⁸ em tubos de ensaios contendo 9 mL de solução salina a 0,85%.

A técnica de plaqueamento usada para contagem foi de “Placa Derramada” também conhecida por “Pour Plate”. O meio usado foi o de Ágar Contagem de Placas, conhecido como

Plate Count Agar (PCA) - OXOID, preparado com a mesma água do mar utilizada para o inóculo das cepas e esterilizada em autoclave a 121°C/15 minutos.

Foi pipetados 1 mL de cada diluição e transferido para placas de Petri estéreis (em duplicatas). A cada placa foram adicionados 15 mL do meio PCA. Toda a operação foi feita dentro de 15 minutos a partir da preparação das diluições. As placas foram imediatamente submetidas a movimentos de rotação para mistura e homogeneização do meio com as amostras. Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas invertidas a 35°C por 24 horas.

Após incubação, as placas escolhidas para contagem foram aquelas que continham entre 25 e 250 Unidades Formadoras de Colônias (Maturin & Peeler, 2001). O contador utilizado foi o contador QUÉBEC. Das contagens realizadas foi calculado a média das placas por diluição.

Os inóculos foram nomeados pela ordem: T₀, T₂, T₄, T₆, T₈, T₂₄, T₄₈, T₇₂, T₉₆, T₁₂₀, T₁₄₄, T₁₆₈, T₁₉₂ e T₂₁₆, representando as horas correspondentes. As contagens da bactéria nos tempos zero, duas, seis e oito horas foram retirados do mesmo frasco.

Durante todo o experimento houve controle da cepa de *E.coli*, a fim de se verificar sua pureza.

Em todos os experimentos foram determinados assepticamente, a salinidade e o pH da água inoculada. No decorrer do experimento estas determinações foram repetidas, por amostragem dos frascos no momento da inoculação, a fim de verificar-se alterações nestes parâmetros.

3.3 CÁLCULO DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA

A taxa de sobrevivência das células de *E. coli* nos dez experimentos e nos dois tratamentos (presença e ausência de luz) foi obtido através da fórmula descrita abaixo (Sinton *et.al.*, 1999):

$$\frac{N}{P = 100}$$

onde:

P = percentual de sobrevivência no tempo T₂₁₆

N = Contagem final das Unidades Formadoras de Colônias (UFC final)

N_0 = Contagem inicial das Unidades Formadoras de Colônias (UFC inicial)

Os valores utilizados no cálculo da taxa de sobrevivência foram aqueles resultantes do teste de CPP expresso em números inteiros (UFC/mL).

3.4 TESTES ESTATÍSTICOS

Dos resultados de cada contagem foram calculados seus respectivos logaritmos, sendo usados no traçado dos gráficos, tabelas e nos testes estatísticos.

Para se testar a influência da duração do período de tempo da inoculação e influência da ausência ou presença de luminosidade sobre a contagem de UFC/mL de *E.coli*, foi utilizado o seguinte delineamento experimental: (a) os frascos contendo água do mar foram inoculados e submetidos a dois tratamentos : ausência e presença de luz solar; (b) os inóculos foram mantidos durante 14 intervalos (blocos) sendo estes de duas horas no 1º dia (de zero a oito horas); e do 2º ao 9º dia, a cada 24 horas; (c) a significância estatística da variável **F** entre tratamentos, blocos e para a interação entre os mesmos foi avaliada considerando-se o nível $\alpha = 0,05$. Os experimentos foram repetidos por 10 vezes.

Os dados obtidos foram submetidos à transformação logarítmica para aplicação da técnica estatística da Análise de Variância bifatorial, pela qual se testou a influência dos fatores causais considerados sobre a variável “log da UFC/mL de *E. coli*”. A possibilidade de interação entre tratamentos e blocos foi devidamente avaliada, pois os dados mostravam uma redução na contagem de UFC/mL de *E. coli* em proporção inversa com a duração do período de incubação, na presença de luminosidade. Deve-se ressaltar que, no caso de ocorrerem variações estatisticamente significantes em função do tempo de inoculação, testes de discriminação de médias não seriam aplicados, pois a variável “duração do período de inoculação” pode assumir quaisquer valores, o que minimiza a eficiência do método para indicar quais períodos são realmente relevantes para o processo.

4 RESULTADOS

Após a realização dos 10 experimentos, conforme metodologia descrita no capítulo anterior, foram obtidos os seguintes resultados:

1. As cepas de coliformes isoladas de uma galeria pluvial apresentaram na placa de EMB coloração típica e quando submetidas aos testes bioquímicos comprovaram sua identificação como *E. coli* (tabela I).

Tabela I – Resultados dos testes aplicados às cepas, presumivelmente de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água provenientes da galeria pluvial localizada na Praia do Mucuripe, Fortaleza, Ceará

GRAM	Fermentação de Caldo Lauril Sulfato (CLS)	IMVIC			
		INDOL	VM	VP	CITRATO
Bastonetes Gram negativos	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo

2. Foi observado que, para as cepas expostas à luz solar, durante os períodos nublados ou chuvosos, onde a luminosidade incidente sobre as cepas diminuía, a culturabilidade das mesmas resistiu por mais tempo, como se pode observar pelos resultados dos experimentos I, II, V, VI, IX e X plotados na tabela II. Nos experimentos I, II, VI, IX e X, nos quais foi possível detectar células cultiváveis até o tempo máximo T_{216} , a redução logarítmica, no número de UFC/mL foi de 5,58; 6,60; 2,78; 3,39 e 3,84, respectivamente.
3. Nos dias de maior incidência solar, indicado pela temperatura dentro dos frascos, a perda de culturabilidade foi bastante acentuada como pode ser observado nos resultados dos experimentos III, IV, VII e VIII (tabela II).

Tabela II - Contagem de *Escherichia coli* inoculada em água do mar estocada na presença de luz solar expressa em logaritmo do número de Unidades Formadoras de colônias por mililitro (Log UFC/mL), com indicação da média dos vários experimentos por tempo de inoculação.

Tempo (horas)	LOG UFC/mL DOS EXPERIMENTOS EM PRESENÇA DE LUZ SOLAR										Média
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
0	8,91	9,07	9,17	8,73	8,93	8,47	9,09	8,85	9,06	8,98	8,93
2	8,97	9,30	8,51	8,75	9,03	8,80	8,88	8,45	9,15	8,89	8,87
4	8,93	9,07	7,82	8,79	8,66	8,4	3,77	7,92	9,03	8,78	8,12
6	9,21	8,80	7,04	8,75	8,92	8,33	3,48	6,38	8,06	8,94	7,79
8	9,01	8,41	6,46	8,99	8,57	8,15	<1	6,64	7,86	8,78	8,10
24	8,88	8,56	5,24	8,34	8,74	7,98	<1	6,10	6,11	8,36	7,59
48	8,73	8,34	4,29	4,95	8,34	7,78	<1	<1	5,32	5,70	6,68
72	8,21	7,56	2,16	6,22	7,36	7,35	<1	<1	4,46	6,38	6,21
96	7,07	5,78	<1	4,59	5,84	7,22	<1	<1	5,09	5,95	5,93
120	6,09	6,31	<1	<1	5,12	7,14	<1	<1	<1	6,70	6,27
144	5,41	5,84	<1	<1	3,25	6,83	<1	<1	4,92	6,73	5,50
168	4,62	4,94	<1	<1	2,53	6,63	<1	<1	4,73	6,59	5,01
192	3,14	4,75	<1	<1	2,63	6,59	<1	<1	5,00	6,28	4,73
216	3,33	2,47	<1	<1	<1	5,69	<1	<1	5,67	5,14	4,46

4. No experimento controle, onde os frascos de cor âmbar inoculados com *E.coli* foram mantidos na ausência de luz, as células cultiváveis persistiram por todo o tempo do experimento apresentando comportamento constante, sem perda significativa da culturabilidade (tabela III).

Tabela III - Contagem de *Escherichia coli* inoculada em água do mar estocada na ausência de luz solar expressa em logaritmo do número de Unidades Formadoras de colônias por mililitro (Log UFC/mL), com indicação da média dos vários experimentos por tempo de inoculação.

Tempo (horas)	LOG UFC/mL DOS EXPERIMENTOS EM AUSÊNCIA DE LUZ SOLAR										Média
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
0	8,91	9,07	9,17	8,73	8,93	8,47	9,09	8,85	9,06	8,98	8,93
2	9,06	9,00	9,01	8,73	8,92	9,00	8,88	8,79	9,28	9,04	8,97
4	9,06	9,09	9,13	8,86	8,82	8,82	8,77	8,89	9,31	9,02	8,98
6	9,08	9,07	9,10	8,88	8,93	8,77	8,48	8,76	9,11	9,06	8,92
8	8,65	9,28	9,09	9,18	9,08	8,51	8,80	8,63	9,24	9,01	8,95
24	9,07	9,00	9,38	9,10	9,11	8,49	8,81	8,88	9,33	9,11	9,03
48	8,85	9,12	9,00	9,18	8,91	8,24	8,85	8,76	8,94	8,89	8,87
72	8,99	9,26	9,04	8,67	8,59	8,17	8,69	8,72	8,89	8,86	8,79
96	8,66	8,97	8,99	8,39	8,61	8,21	8,67	8,81	8,93	8,84	8,71
120	8,89	8,63	8,82	8,73	8,50	8,21	8,64	8,77	8,75	9,61	8,76
144	8,86	8,75	8,72	8,45	8,67	8,24	8,61	8,43	9,31	8,73	8,68
168	8,74	8,76	8,98	8,41	8,63	8,21	8,62	8,48	8,95	8,69	8,65
192	8,70	8,82	8,59	8,41	8,63	8,28	8,40	8,33	8,73	8,45	8,53
216	8,90	8,73	8,63	9,30	8,54	8,00	8,56	8,48	8,92	8,54	8,66

5. As médias das temperaturas das amostras de água do mar contidas nos frascos inoculados e expostos à luz solar, nos 10 experimentos, foram: 28,75°C, 36,25°C, 38,50°C, 38,10°C, 33,25°C, 35,20°C, 33,95°C, 34,85°C, 34,60°C, 34,60°C, 35,70°C, 33,70°C, 35,40°C, e 35,80°C, respectivamente (tabela IV). Nos frascos - controle as médias das temperaturas foram: 28,75°C, 28,45°C, 28,65°C, 28,45°C, 28,50°C, 28,45°C, 28,55°C, 28,25°C, 28,55°C, 28,35°C, 28,70°C, 28,70°C, 29,00°C, 28,80°C (tabela V).

Tabela IV – Dados de temperatura, expressa em graus Celsius (em °C), relativos aos experimentos realizados na presença de luz solar, indicando a média final por experimento.

Tempo (horas)	TEMPERATURA EM (°C) DOS EXPERIMENTOS EM PRESENÇA DE LUZ										Média por Tempo (horas)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
0	29,0	28,0	28,5	28,0	29,0	29,0	29,0	29,0	29,0	29,0	28,75
2	32,0	33,0	43,0	27,0	35,0	40,0	45,0	45,0	31,5	31,0	36,25
4	27,5	33,5	46,0	27,5	41,0	42,0	45,0	48,5	41,5	32,5	38,50
6	31,5	36,0	42,0	27,0	43,0	40,5	40,0	46,0	43,0	32,0	38,10
8	28,5	30,5	37,0	28,0	35,0	37,5	39,0	35,0	32,0	30,0	33,25
24	34,5	30,0	40,5	41,0	31,5	28,5	39,0	43,0	33,0	31,0	35,20
48	30,0	31,0	26,5	36,0	46,0	37,0	35,0	35,0	30,0	33,0	33,95
72	26,5	33,0	40,0	42,0	29,0	40,5	35,0	39,0	31,0	32,5	34,85
96	30,0	33,0	27,5	45,0	39,0	41,0	35,0	34,0	30,5	31,0	34,60
120	34,0	32,0	46,0	36,5	30,0	36,0	34,0	36,0	32,0	29,5	34,60
144	33,0	30,5	38,0	44,5	40,5	39,0	35,0	34,0	31,5	31,0	35,70
168	33,0	30,5	38,5	37,0	37,0	33,0	33,0	34,0	30,0	31,0	33,70
192	30,0	30,0	41,5	44,0	38,0	40,0	35,0	33,0	31,0	31,5	35,40
216	32,0	31,0	44,0	41,0	38,0	41,5	35,0	34,0	30,5	31,0	35,80

Tabela V – Dados de temperatura, expressa em graus Celsius (em °C), relativos aos experimentos realizados na ausência de luz solar, indicando a média final por experimento.

Tempo (horas)	TEMPERATURA EM (°C) DOS EXPERIMENTOS EM AUSÊNCIA DE LUZ										Média por Tempo (horas)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
0	29,0	28,0	28,5	28,0	29,0	29,0	29,0	29,0	29,0	29,0	28,75
2	26,5	28,0	28,5	28,0	29,0	28,5	29,0	29,0	28,5	29,5	28,45
4	27,0	28,5	28,0	28,5	29,0	28,5	29,0	29,0	29,0	30,0	28,65
6	27,0	28,0	28,5	27,5	29,0	28,5	28,0	29,0	29,0	30,0	28,45
8	27,0	27,5	28,5	27,5	29,0	28,0	29,5	29,0	29,0	30,0	28,50
24	27,0	29,0	28,5	28,0	28,0	28,0	29,0	29,0	29,0	29,0	28,45
48	27,5	29,0	27,5	28,0	29,0	29,0	29,5	29,0	28,0	29,0	28,55
72	27,0	29,0	26,5	28,0	28,0	28,0	29,0	29,0	29,0	29,0	28,25
96	27,0	29,0	27,5	28,5	29,0	28,0	29,5	29,0	29,0	29,0	28,55
120	27,0	29,0	28,0	29,0	28,0	27,5	29,0	28,5	28,5	29,0	28,35
144	27,0	29,5	28,0	29,5	29,0	29,0	29,0	28,5	28,5	29,0	28,70
168	28,0	29,0	28,0	29,0	29,0	28,0	28,5	29,0	29,5	29,0	28,70
192	29,0	29,0	28,0	30,0	29,0	29,0	28,5	29,0	29,0	29,5	29,00
216	28,5	29,0	28,0	29,0	29,0	28,5	29,0	29,0	29,0	29,0	28,80

6. Os valores de salinidade e pH das amostras de água do mar, contidas nos frascos mantidos em presença e ausência de luz, variaram de 33 a 35‰ e de 7,23 a 7,56, respectivamente (tabela VI).

Tabela VI – Medidas de salinidade e pH das amostras de água do mar durante os experimentos.

Variáveis	EXPERIMENTOS
-----------	--------------

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Salinidade‰	35	35	33	35	35	35	33	35	35	35
pH	7,34	7,56	7,35	7,34	7,34	7,36	7,37	7,56	7,23	7,42

7. A taxa de sobrevivência (%) das células expostas à presença de luz nos experimentos foi de 0,00026; 0,000025; 0,16; 0,040 e 0,014 respectivamente (tabela VII).

Tabela VII –Taxa de sobrevivência das células de *E. coli* nas amostras de água do mar dos dez experimentos em presença e ausência de luz solar.

EXPERIMENTOS	TRATAMENTOS	
	Presença de luz	Ausência de luz
I	0,00026	100,0
II	0,0000025	45,0
III	0	28,7
IV	0	430,0
V	0	35,7
VI	0,16	3,25
VII	0	29,0
VIII	0	50,7
IX	0,04	72,6
X	0,014	36,2

8. Os gráficos relativos aos valores de *E. coli* obtidos nos diferentes tempos de inoculação das cepas na água do mar, mostraram um rápido declínio nas primeiras horas de exposição das culturas à radiação solar (figuras 3-12)

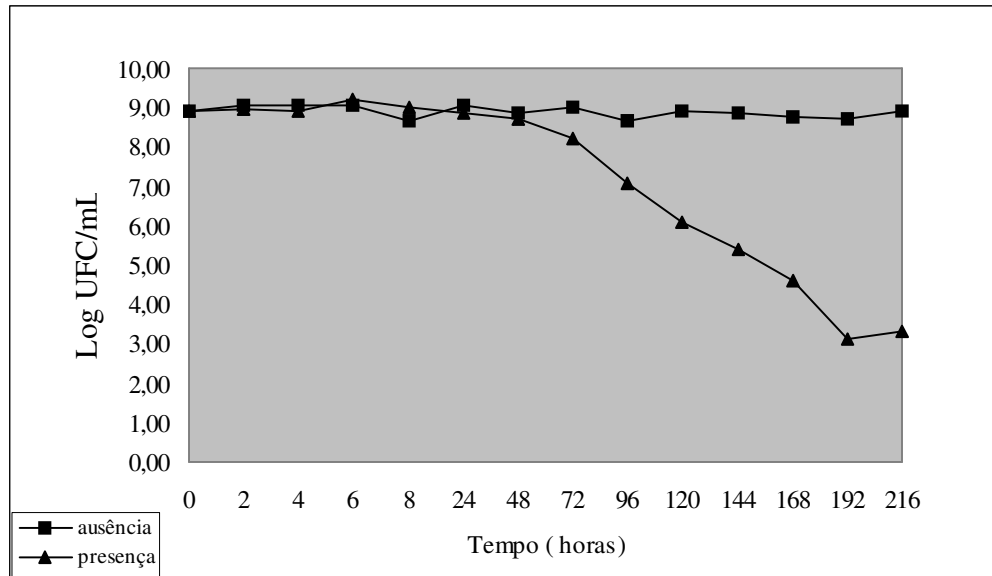


Figura 3–Valores médios obtidos no primeiro experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

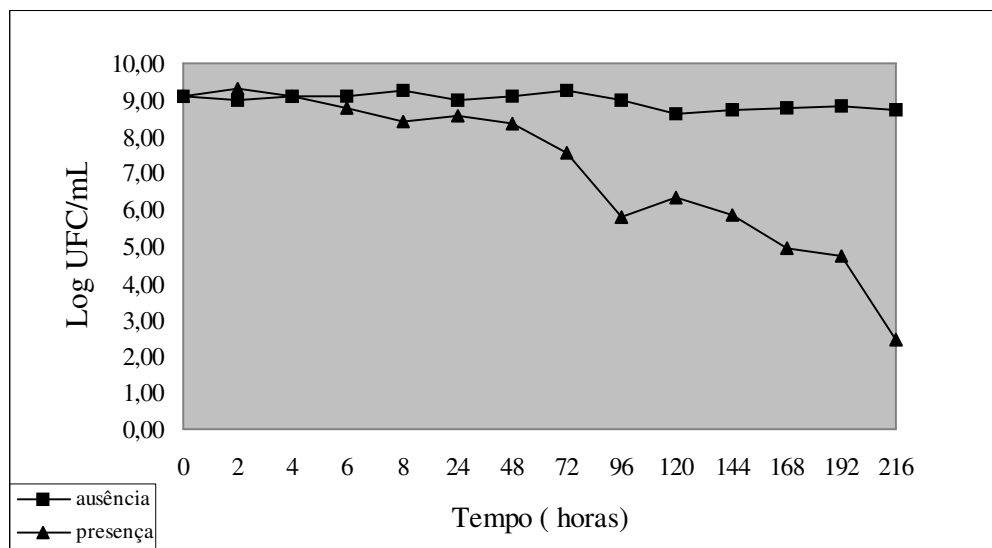


Figura 4 –Valores médios obtidos no segundo experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

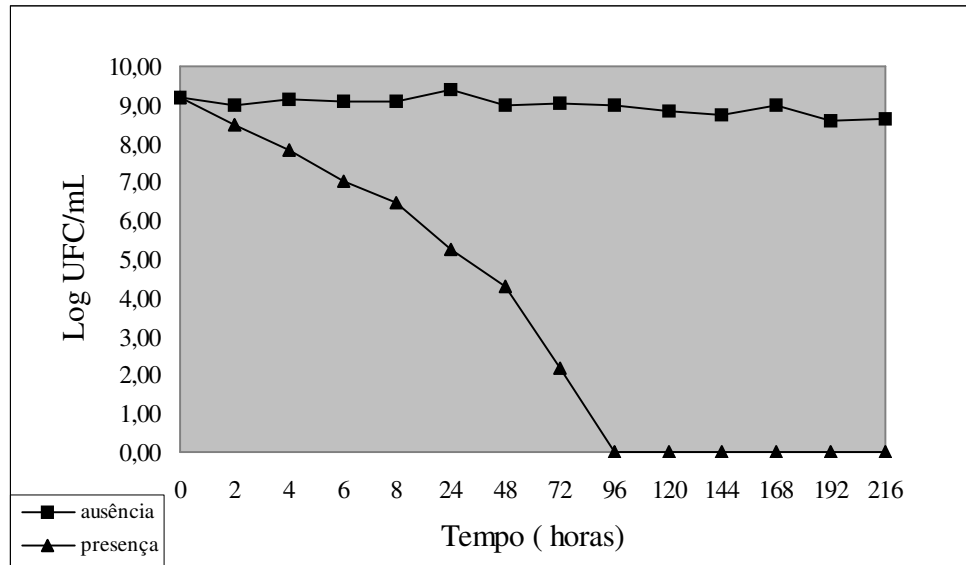


Figura 5 – Valores médios obtidos no terceiro experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

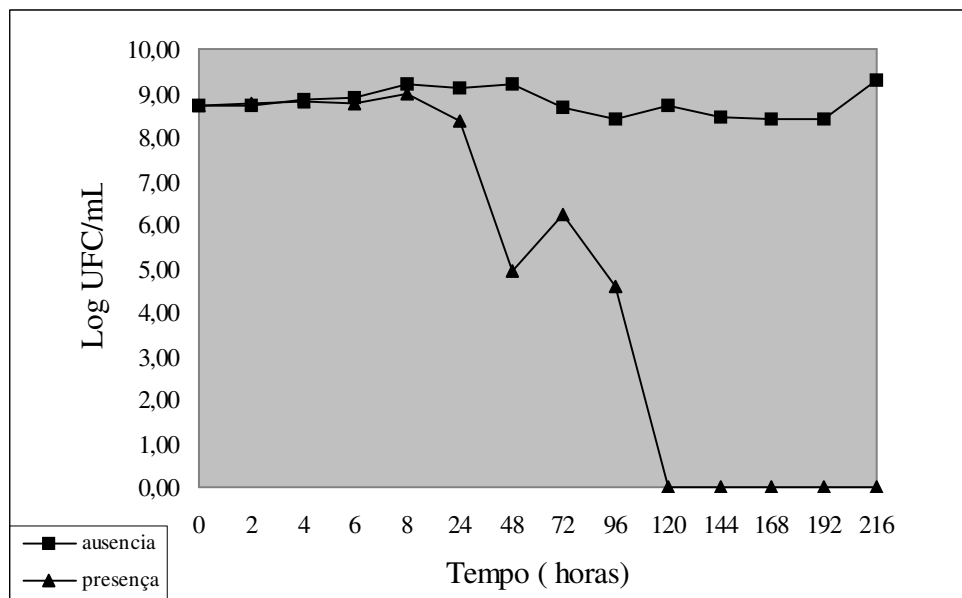


Figura 6 – Valores médios obtidos no quarto experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

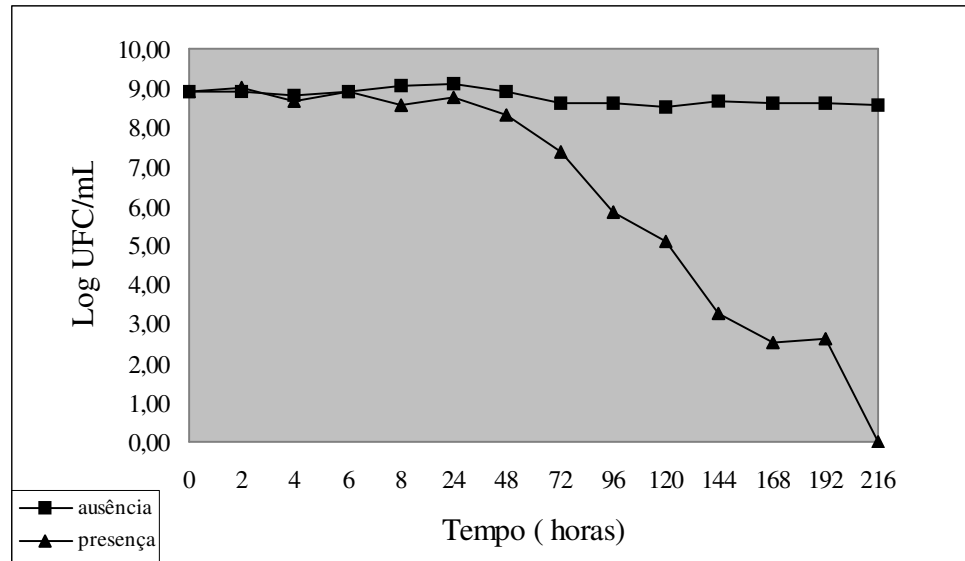


Figura 7 –Valores médios obtidos no quinto experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

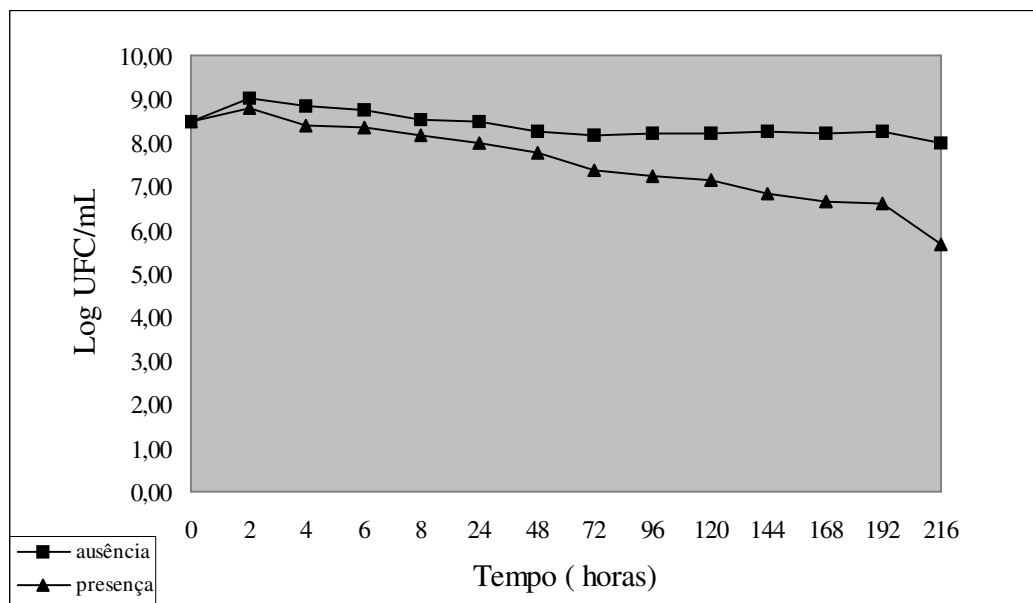


Figura 8 – Valores médios obtidos no sexto experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

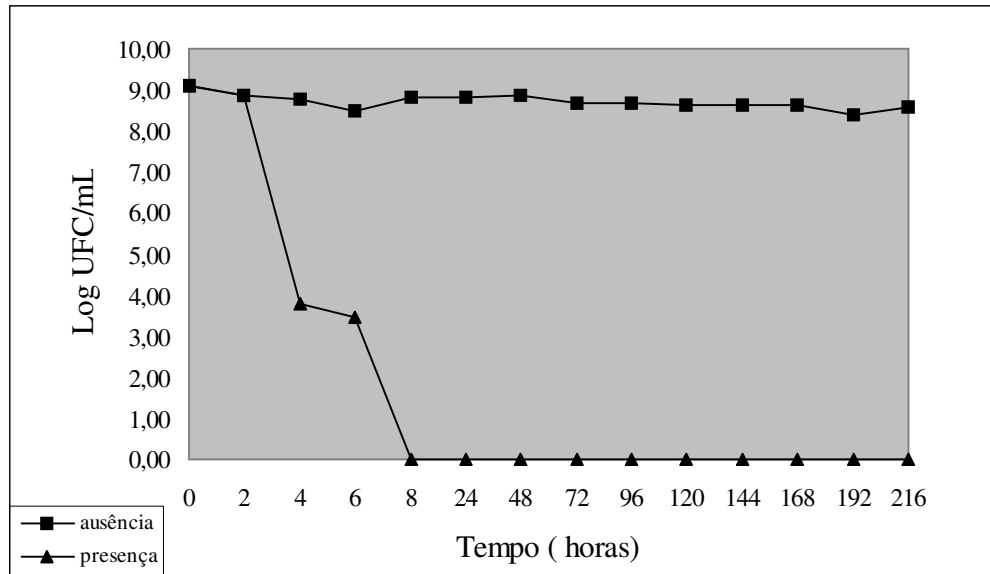


Figura 9 – Valores médios obtidos no sétimo experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

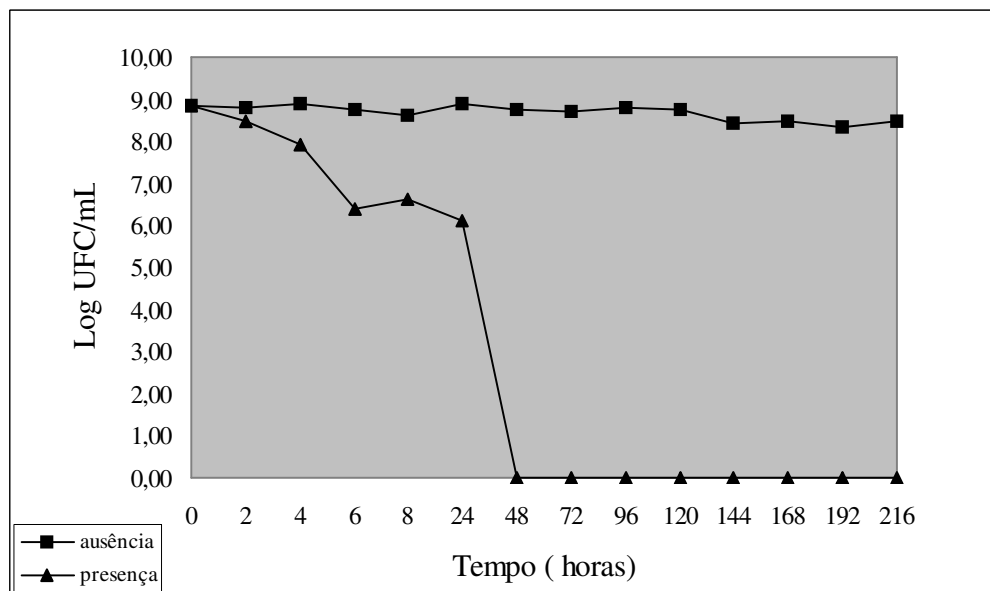


Figura 10 – Valores médios obtidos no oitavo experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

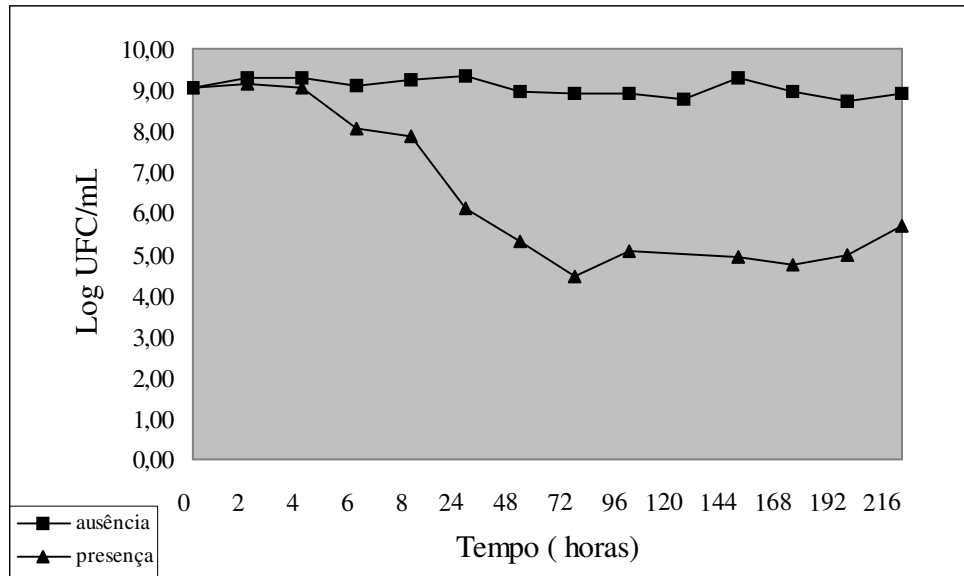


Figura 11 – Valores médios obtidos no nono experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

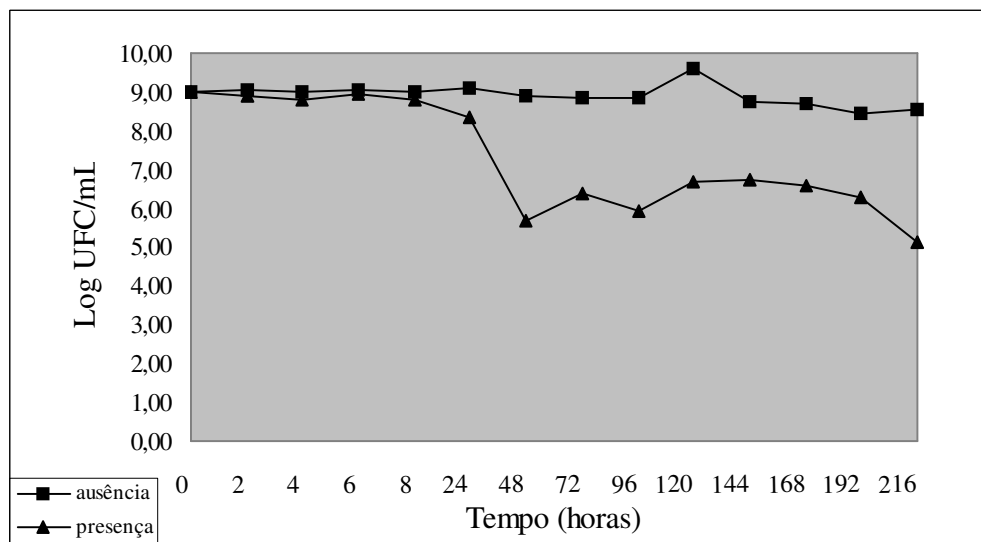


Figura 12–Valores médios obtidos no décimo experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

9. Os valores das médias das contagens de *E. coli* de todos os experimentos, nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada na presença e ausência de luz, estão plotados na figura 13. Observa-se um declínio visível nas contagens de *E.coli* nos frascos mantidos sob a luz solar, enquanto que, aqueles estocados na ausência de luz (controle) permaneceram com valores constantes até o final do experimento.

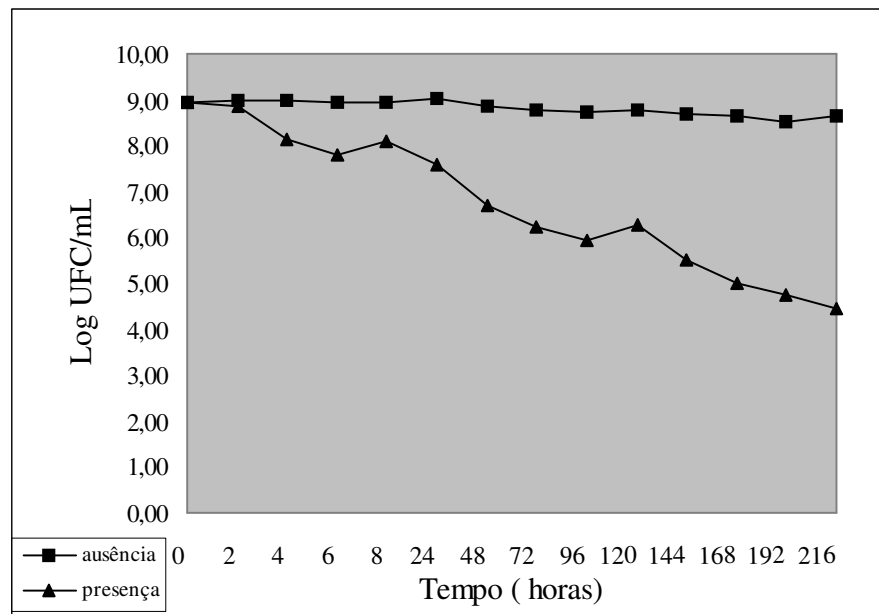


Figura 13–Valores médios obtidos de todos os experimento, relativos às contagens de *Escherichia coli* nos diferentes tempos de inoculação em água do mar, estocada em presença e ausência de luz, expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

10. As figuras 14 e 15 mostram a variação dos valores médios relativos às contagens de *E.coli* inoculada em água do mar estocada na presença e ausência de luz, expressa em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) versus a média das temperaturas. Pelos gráficos observa-se que a temperatura não é significativa em relação à sobrevivência da bactéria em água do mar e que somente sua elevação não seria suficiente para eliminar *E.coli*.

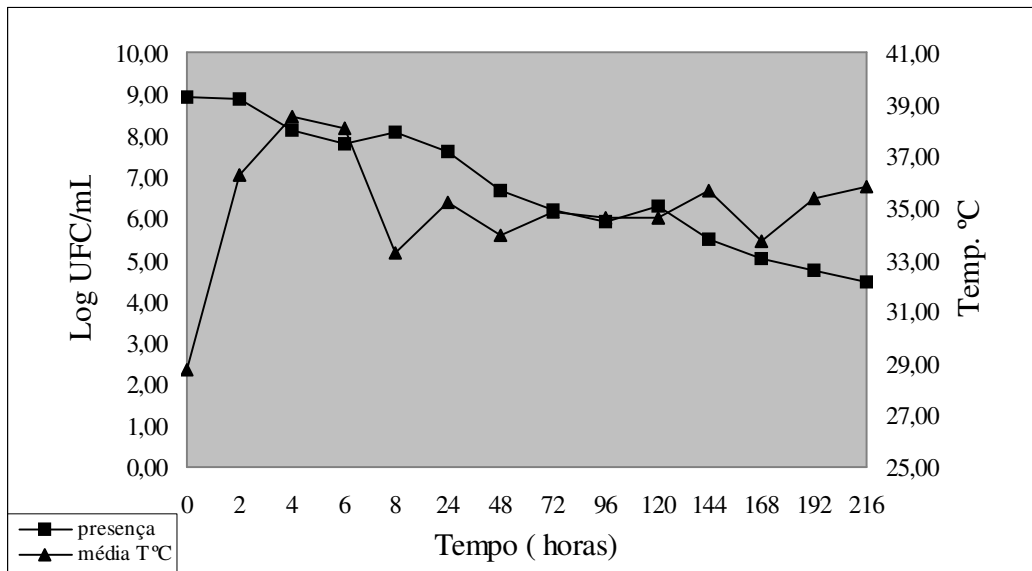


Figura 14 – Resultados da média dos Log UFC/mL dos experimentos em presença de luz *versus* a média das temperaturas por horas de incubação.

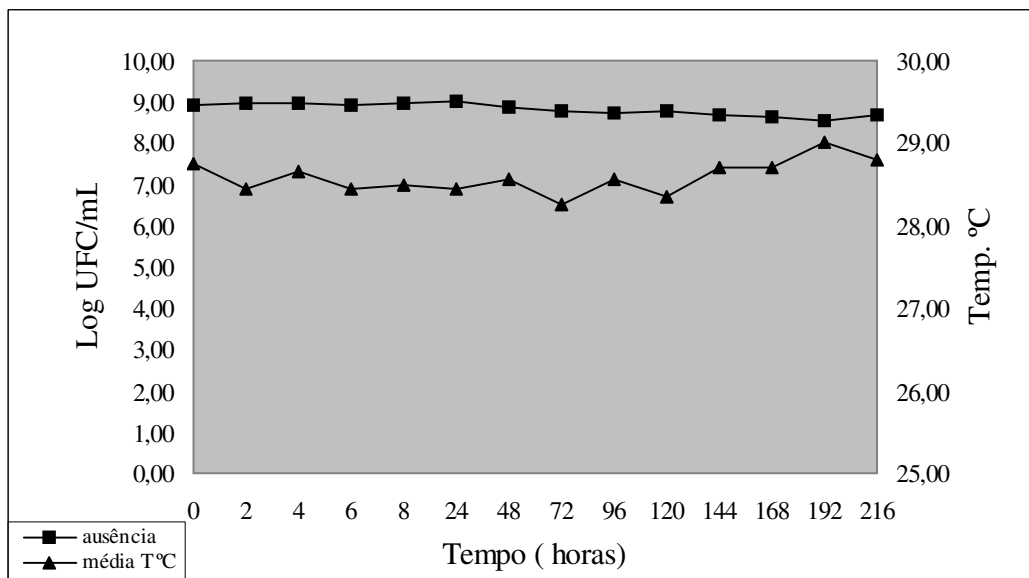


Figura 15 – Resultados da média dos Log UFC/mL dos experimentos em ausência de luz *versus* a média das temperaturas por horas de incubação

11. Os dados da Análise de Variância (ANOVA) mostraram que a luz solar influenciou na redução do número de *E.coli* na água do mar, sendo também o tempo de exposição a essa radiação, fator significativa na redução dessa bactéria (tabela VIII).

Tabela VIII – Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos dados logaritmizados das contagens de *Escherichia coli* inoculada em água do mar, obtidos em amostras mantidas na presença ou ausência de luz, em diferentes períodos de exposição.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	SIG
Total	279	2.382,7	8,5	-	-
Luz solar (A)	1	769,5	769,5	232,13	<0,05
Tempo (B)	13	432,9	33,3	10,04	<0,05
Interação A x B	13	345,0	26,5	8,01	<0,05
Erro	252	835,2	3,3	-	-

5 DISCUSSÃO

O fato das cepas de *E. coli* (tabela I), usadas nos experimentos, terem sido coletadas na saída de uma galeria pluvial exposta ao fluxo das marés, pode ter influenciado na sobrevivência dessas, durante todos os experimentos. De alguma forma, esse ambiente pode ter proporcionado uma adaptação prévia às condições osmóticas do meio marinho.

A ausência de uma pré-adaptação ao choque osmótico no meio ambiente salino é extremamente prejudicial para as células. O choque osmótico é responsável pela perda de água intracelular para o meio, o que resulta, conseqüentemente, numa redução do turgor e numa retração do volume citoplasmático (Carlucci & Pramer, 1960; Munro *et al.*, 1989).

Segundo Munro *et al.* (1987 e 1989) e Gauthier *et al.* (1987), células pré-adaptadas à altas osmolaridades são resistentes à água do mar.

Os inóculos de *E. coli* expostos à luz solar em água do mar mostraram um declínio rápido na sua sobrevivência (tabela II). Observa-se que nos experimentos III, IV, VII e VIII quando a luminosidade era maior, a queda na sobrevivência das cepas foi muito mais drástica do que nos dias nublados ou chuvosos (experimentos I, II, V, VI, IX e X) (tabela II, figuras 3 a 12).

As cepas inoculadas nas mesmas condições daquelas expostas à luz solar mas incubadas em ausência de luz (controle), mostraram uma constância na sua culturabilidade, tendo sobrevivido sem apresentar decréscimo significativo durante todo o experimento (tabela III, figuras 3 a 13), o que comprova a afirmação de Gourmelon *et al.* (1997) de que a sobrevivência de *E. coli* em água marinha, no escuro, é bem maior do que em condições de iluminação. Os autores demonstraram que as células de *E. coli* inoculadas em água do mar e incubadas em ausência de luz permaneciam viáveis e culturáveis durante mais de 40 horas.

Vieira *et al.* (2001) em experimentos sobre a viabilidade de *E. coli* em água do mar estocaram frascos inoculados sobre bancadas à luz de laboratório e a redução do número de bactérias no final de 168 horas não foi da grandeza encontrada por Pommepuy *et al.* 1996. No entanto, aqueles autores alegaram que essa discrepância foi causada pelo fato de que em laboratório, a intensidade dos raios ultra violeta é mais baixa do que em ambientes abertos

O efeito da radiação solar sobre as bactérias entéricas tem tido particular importância para a avaliação do impacto causado pelos descartes de esgotos em águas marinhas. As pesquisas se concentram principalmente na influência desse parâmetro sobre a redução de *E. coli* e enterococos que são importantes indicadores de poluição fecal nesses ambientes (Alkan *et al.*, 1995).

Pommeputy *et al.* (1996) demonstraram que o efeito tóxico da radiação solar sobre a *E. coli* em água do mar reduz rapidamente a habilidade da bactéria em formar colônias.

A sobrevivência de bactérias entéricas no mar é altamente afetada tanto pela radiação UV como pela luz visível (Barcina *et al.*, 1990).

De acordo com Trousselier *et al.* (1998), cepas de *E. coli* submetidas à luz apresentaram em meios sólidos, baixas taxas de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) com ou sem estresse hiperosmótico e após 40 horas de exposição à luz na presença de salinidade, apenas o estado viável mas não culturável, foi detectado. Em contagens através do método de “Contagens Direta de Viáveis” também conhecido por Direct Viable Count (DVC), foi possível se visualizar células, porém este fato não foi observado no método de plaqueamento da Contagem Padrão em Placas (CPP), onde os resultados são apresentados em UFC. Em compensação, no escuro, uma proporção significativa das células de *E. coli* permaneceu culturável. Para os autores, a baixa da culturabilidade das células não se deve à formação de compostos tóxicos na água do mar, mas sim à Espécies Reativas de Oxigênio (ERO: oxigênio simples; ânions superóxidos; peróxidos de hidrogênio e radicais hidroxil) e mecanismos relacionados a respostas celulares.

A geração de Espécies Reativas de Oxigênio na presença de luz visível foi comprovada por Foote, (1996).

As médias das temperaturas dentro dos frascos com água do mar inoculados e expostos à luz solar, medidos durante o início de cada experimento, ficaram entre 28,75 a 38,5° C (tabela IV, figura 14). Já na ausência de luz, as médias das temperaturas dos 10 experimentos (um a um) variaram de 28,25 a 29,00° C (tabela V, figura 15). Pelas figuras 14 e 15 observa-se que a temperatura não se correlaciona com a grandeza da população bacteriana de *E. coli* em água do mar na presença ou ausência de luz.

Esta constatação foi anteriormente observada no trabalho de Alkan *et al.* (1995). Segundo estes autores, a temperatura não exerce nenhum efeito significativo sobre a sobrevivência bacteriana em água do mar e em presença de luz. As taxas de mortalidade são independentes da variação de temperatura de 10 a 30°C. Já Gauthier *et al.* (1993) afirmam que o risco de poluição de águas marinhas por *E. coli* e por extensão, pelas enterobactérias patogênicas para o homem, é muito mais acentuado em águas quentes e ricas em matéria orgânica.

A salinidade e o pH durante todos os experimentos variaram de 33 a 35‰ e 7,23 a 7,56, respectivamente. A salinidade não exerceu efeito sobre a culturabilidade das células inoculadas, como se observa pelo padrão mantido pelas cepas incubadas em ausência de luz solar.

Gauthier (1992) afirma que células cultivadas em meios alcalinos (pH > 7,5), em anaerobiose e à alta temperatura (40°C), isto é, em condições semelhantes às encontradas no intestino, são muito sensíveis à água do mar e evoluem mais rapidamente para o estágio de dormência. O autor mostrou que a capacidade de sobrevivência das enterobactérias no ambiente marinho estava inicialmente ligada ao poder desses microrganismos para resistir ao choque osmótico e à possibilidade que elas têm de restaurar a homeostase quando de sua chegada ao mar. A agilidade nesse processo de recuperação, segundo o autor, determina o futuro das células, seja no sentido de uma latência, seja na direção de uma adaptação sob uma forma ativa que permanecerá cultivável.

Munro *et al.* (1987) demonstraram que a adaptação de bactérias em meio salino proporcionava um aumento da sobrevivência delas em água do mar.

De acordo com Rozen & Belkin (2001), o pH da água do mar se situa normalmente entre 7,5 e 8,5 e é influenciado pela temperatura, pressão e atividades fotossintética e respiratória dos microrganismos. Segundo os autores, um pH ácido, em torno de 5,0 favorece à sobrevivência da *E. coli*, ao passo que o pH da água do mar, em torno de 8,0, contribui para um efeito deletério na sobrevivência da bactéria.

O fato das cepas de *E. coli* terem sido inoculadas em fase exponencial de crescimento, parece ter sido um dos fatores para a perda de culturabilidade em presença de luz solar, o que é confirmado por Gourmelon *et al.* (1977) quando demonstram que a *E. coli* exposta à luz visível em água do mar é significativamente mais resistente quando a exposição se dá durante a fase estacionária, do que em fase exponencial.

Segundo Loewen *et al.* (1998), a resistência é dependente do fator sigma (σ^S) RpoS específico da fase estacionária e que regula mais de 30 genes, estando implicado, entre outras funções, no processo de osmoproteção,

termotolerância e proteção ao estresse oxidativo o qual se dá pela indução da síntese de proteínas que estão envolvidas nesse processo de proteção.

Dupray & Derrien (1995) demonstraram que a perda de culturabilidade de bactérias lançadas em água do mar é menor quando estas transitam anteriormente em águas usadas antes de serem lançadas no ambiente marinho. O tempo para adaptação e menor estresse dos microrganismos seriam fundamentais nessa sobrevivência.

Gauthier (1992) confirma essas informações concluindo que a sobrevivência de bactérias de origem antrópica no ambiente marinho, não depende unicamente da qualidade do meio receptor, mas igualmente da trajetória percorrida.

Gauthier *et al.* (1992) também demonstraram que a viabilidade da *E. coli* em água do mar é dependente do estágio de crescimento, sendo que para os autores, a viabilidade diminui durante a fase lag, diminuindo progressivamente durante a fase log e sendo máxima durante a fase estacionária, isto devido à redução do metabolismo que ocorre durante esta última fase, tornando a cepa mais resistente aos múltiplos estresses.

Até a década de 70, a sobrevivência das bactérias entéricas no ambiente marinho era considerada como de curta duração. Supunha-se que essas bactérias eram destruídas rapidamente pelos chamados fatores antagonistas (temperatura, radiação solar, salinidade, pH, etc) e que representavam o “fator de autodepuração” do meio marinho (Gauthier, 1992).

A descoberta de que essas bactérias entéricas podem adaptar-se às condições hostis do ambiente através de um estado de “dormência” (VBNC) mantendo a virulência, modificou os conceitos sistemáticos de mortalidade e recolocou em novos termos o problema dos riscos sanitários veiculados pelos rejeitos contendo essas bactérias e descartados em ambiente marinho (Gauthier *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992; Pommeypuy *et al.*, 1996).

O percentual de sobrevivência das células de *E.coli* no presente trabalho na presença de luz foi baixo se comparado com o controle, na ausência de luz. Dos experimentos que apresentaram células viáveis até o final, o único que teve um percentual relativamente alto, foi o VI (tabela VII, figuras 8). Quanto ao controle, observa-se que no experimento IV (tabela VII, figura 6) o percentual de sobrevivência foi elevado, apresentando um pico de crescimento bastante significativo no final do experimento.

Vieira *et al.* (2001) também observaram picos de crescimento da cepa de *E.coli* em água do mar durante os seus experimentos e atribuíram à presença de matéria orgânica solubilizada na água, que mesmo depois de esterilizada favoreceu o crescimento da bactéria.

Davies & Evison (1991) analisando a sobrevivência de *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium expostas à água do mar observaram uma associação estatisticamente significativa entre a redução bacteriana e a salinidade. Resultados apresentados neste trabalho demonstram que o efeito letal da luz é otimizado pela alta salinidade da água.

Rozen & Belkin (2001) apresentaram resultados de 74% de sobrevivência em bactérias expostas a 25% de água do mar por 48 horas. A monitoração da sobrevivência da *E. coli* por 8 dias em salinidades de 1; 1,5; 2,5; e 3% permitiu que os autores concluíssem que a diminuição da salinidade era acompanhada por um aumento de sobrevivência. A limitação de nutrientes, produto secundário do estresse osmótico era naquele momento um fator mais dominante que a salinidade.

A Análise de Variância, a nível de $< 0,05$ demonstrou a significância existente entre o declínio na culturabilidade das células expostas à luz solar e o tempo de exposição a que estas estavam submetidas. Esta correlação foi anteriormente bem demonstrada nos trabalhos de Barcina *et al.* (1990); Davies & Evison (1991); Pommepey *et al.* (1996); Gourmelon *et al.* (1994 e 1997).

Muitos estudos têm sido efetuados baseados na perda da culturabilidade e, baixos valores de contagens têm sido obtidas das espécies bacterianas que mantêm estados de VBNC. Byrd & Colwell (1993) em experimentos com *E. coli* em água do mar artificial, observaram que a bactéria manteve sua culturabilidade por, no mínimo, três anos, adaptando-se seletivamente à salinidade além de também reter plasmídios sob esta condição. Segundo os autores, esse fato tem implicações na liberação, no meio marinho, de microrganismos geneticamente modificados.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

1. A resistência apresentada pela bactéria *E. coli* a água do mar nos dias nublados ou chuvosos é um fator importante para Saúde Pública, uma vez que sua sobrevivência na água do mar nessas condições é muito maior do que nos dias ensolarados, o que acentua o risco de transmissão de doenças entéricas aos usuários das praias.
2. Considerando a baixa resistência da *E.coli* quando na água do mar sob forte influência de raios solares, caso das águas costeiras nordestinas, era de se esperar baixas taxas desse microrganismo nesses ambientes. Entretanto isto não ocorre, certamente porque as praias recebem constantemente um grande aporte de material fecal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkan, U.; Elliot, D.J. & Evison, L.M. Survival of enteric bacteria in relation to simulated solar radiation and other environmental factors in marine waters. *Water Research*, New York, v.29: p.2071-2081, 1995.
- Anderson, J.C.; Rhodes, M.& Kator, H. Sublethal stress in *Escherichia coli*: a function of salinity. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 38, p. 1147-1152, 1979.
- Barbosa, H.R. & Torres, B.B. *Microbiologia Básica*, Atheneu (ed.), 196 p., São Paulo, 1999.
- Barcina, I.; Gonzales, J.M.; Iriberry, J. & Egea, L. Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 68, p. 189-198, 1990.
- Baross, J.A. Halophilic microorganism, p 194-202, *In M.L.Speck Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association (APHA) (ed.), Washington, 1976.
- Berzin, G. Monitoragens do emissário submarino de Santos – SP - Brasil em 10 anos de operação, p. 22-27, *In Anais do 16 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Goiânia, 1991.
- Bier, O. Morfologia geral das bactérias, p. 14-27, *In Bier, O. (ed.), Bacteriologia e Imunologia em suas aplicações à Medicina e à Higiene*, Melhoramentos, 14. ed., São Paulo, 1970.
- BRASIL. Constituição (1988) – *Constituição da Republica Federativa do Brasil*. Senado, Brasília, 1988.
- BRASIL. *O Brasil e o Mar no Século XXI: Relatório aos Tomadores de Decisões do País*. Comissão Nacional Independente dos Oceanos, 408 p., Rio de Janeiro, 1998.
- BRASIL. *A Lei da vida: a lei dos crimes ambientais*. Lei nº 9.605 de 12 de Fevereiro de 1998. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2000.
- Brenner, D. J. Enterobacteriaceae, p. 409-423. *In: Williams, N.R. (ed). BERGEY`s Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore,1984.
- Brisou, J. *La microbiologie du milieu marin*. Ed. Médicales Flammarion,142 p., Paris,1955.

- Byrd, J.J. & Colwell R. R. Long-term survival and plasmid maintenance of *Escherichia coli* in marine microcosm. *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, v.12, p. 9-14, 1993.
- Caland-Noronha, M.C. & Morais, J.O. Aspectos da poluição marinha em frente ao município de Fortaleza. *Arquivos de Ciências do Mar*, Fortaleza, v.12, nº2, p.109-115, 1972.
- Campos,L.C. & Trabulsi.L.R. Escherichia, p. 215-228, *In* Trabulsi, L.R.(ed.) *Microbiologia*, Atheneu , 3^a. ed., São Paulo, 1999.
- Capra, F. *A Teia da Vida*, Cultrix, 256 p., São Paulo, 1996.
- Capra, F. *Sabedoria Incomum*, Cultrix, 7^a. ed., 279 p., São Paulo, 1988.
- Carlucci, A.F. & Pramer, D. An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater. II: Salinity, Ph and Nutrients. *Applied Microbiology*, Washington, v. 8, p. 247-250, 1960.
- CETESB. Determinação do número mais provável de coliformes totais e fecais pela técnica dos tubos múltiplos. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. *Normalização Técnica nº 15.202*, p.1-21, São Paulo, 1978.
- CETESB. *Relatório da balneabilidade das praias paulistas 1998*. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), 203 p., São Paulo, 1998.
- CONAMA. Resolução nº274, de 29 de novembro de 2000, Conselho Nacional Do Meio Ambiente, *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília,.2000.
- CNUDM. *Convenção Das Nações Unidas Sobre O Direito Do Mar*. Reproduzido pela Diretoria de Hidrografia e Navegação da Marinha do Brasil, 311 p.1988.
- Dajoz, R. *Ecologia Geral*, Vozes, 4^a ed, 472 p., Petrópolis, 1983.
- Davies, C.M. & Evison, L.M. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, nº70, p. 265-274, 1991.
- Dias A.M.G.; Kano, E.; Nakahara, L.K.; Fernandes, S.A.; Kato, M.A.M.F. & Irino, K. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from blood and cerebrospinal fluid. *Revista de Microbiologia*, São Paulo v. 25 nº2, p. 77-82, 1994.
- Dupray E. & Derrien, A. Influence du passage de *Salmonella spp* et *E. coli* en eaux usées sur leur survie ultérieure en eau de mer. *Water Research*, New York, v.29, nº4 p.1005-1011, 1995.

- Feng, P. & Weagent, S.D. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In U.S. Food and Drugs Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. *Bacteriological Analytical Manual online*. FDA/CFSAN.sept 2002. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~bam/bam-4a.html>. acesso em 25/11/2002.
- Figueirôa, A.C.T.A.; Araújo, M.C.D. & Pimentel, V.L. Monitoramento do *Vibrio cholerae* em mananciais abastecedores de água do estado de Pernambuco. In *Anais do Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Sociedade Brasileira de Microbiologia, Salvador, 1999.
- Foot, C.S. Photosensitized oxidation and singlet oxygen; consequences in biological systems. p. 85-134, In. PRIOR, W.A (ed). *Free radicals in biology*. Academic Press, New York, 1976.
- Frazier, W.C. & Westhoff, D.C. *Food Microbiology*. McGraw Hill Book Company (ed.), 3^a ed., New York, 1988.
- Gauthier, M.J.; Munro, P.M. & Mohajer, S. Influence of salts and sodium chloride on the recovery of *Escherichia coli* from seawater. *Current Microbiology*, v.15, p. 5-10, 1987.
- Gauthier, M.J.; Flatau, G.N.; Clement, R.L. & Munro, P.M. Sensitivity of *Escherichia coli* cells to seawater closely depends on their growth stage. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.73, p.257-262, 1992.
- Gauthier, M.J. Influence des systèmes d'osmoregulation sur la survie et l'adaptation des bacteries entériques dans l'environnement marin. In PNUE/OMS – Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Survie des pathogenes. Rapports finaux sur les projets de recherche (1969-1991). *MAP Technical Reports series n° 63*. UNEP, Athens, 1992.
- Gauthier, M.J.; Breittmayer, V.A. & Braux, A.S. Expression génique chez es bactéries entériques dans les conditions marines. In PNUE/OMS – Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Survie des pathogenes. Rapports finaux sur les projets de recherche (1992-1993). *MAP Technical Reports series n° 76*. UNEP, Athens, 1993.
- Gourmelon, M.; Cillard, J. & Pommepuy, M. Visible light damage in *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 77, p. 105-112, 1994.
- Gourmelon, M.; Touati, D.; Pommepuy, M. & Cormier, M. Survival of *Escherichia coli* exposed to visible light in seawater: analysis of rpoS-dependent effects. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, p.1036-1043, 1997.

- Hagler, A.N.; Hagler, L.C.M.; Santos, E.A.; Farage, S.; Silva Filho, J.B.; Schrank, A. & Oliveira, R.B. Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. *The Science of the Total Environment*, Amsterdam, v. 58, p. 151-160, 1986.
- Hagler, A.N. & Hagler, L.C.S.M. Microbiologia Sanitária, p. 85-102. In Roitman, I.; Travassos, L. R. & Azevedo, J. L. (eds.) *Tratado de Microbiologia*, Manole Ltda, São Paulo, 1998.
- Jay, J.M. *Modern Food Microbiology*. Van Nostrand Reinhold Company (ed.), 3^a ed., 641 p., New York, 1986.
- Jeffreys, K. Rescuing the oceans, p. 295-338. In Bailey, R.(ed.), *The true state of the planet*. The Free Press, 472 p., New York, 1995.
- Konemam, E.W.; Allen, S.D.; Dowell, Jr.V.R. & Sommers, H.M. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. Panamericana, 2^a. ed., São Paulo, 1993.
- Lebaron, Ph.; Batailler, N.; Baleux, B. Mobilization of a recombinant nonconjugative plasmid at the interface between wastewater and the marine coastal environment. *FEMS Microbiology Ecology*, v.15, p.61-70, 1994.
- Leitão, M.F.F. Microbiologia de alimentos, p 03-76. In Roitman, I.; Travassos, L. R. & Azevedo, J. L. (eds.) *Tratado de Microbiologia*, Manole Ltda, São Paulo, 1988.
- Lima, R.A.P. *A Ação do homem nos ecossistemas*. Fundação Getúlio Vargas. 1^a.ed., 42p, Rio de Janeiro, 1979.
- Loewen, P.C.; Hu, B.; Strutinsk, J. & Spating, R. Regulation in the rpoS of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*. Ottawa, v.44, n^o8, p. 707-717, 1998.
- Loosanoff, V.L. & Davis, H.C. Rearing of Bivalve Mollusks, p. 1-136. In Russel, F.S. *Advances in marine biology*. Academic Press, New York, 1963.
- Ludwig, R.G. Esgotos Sanitários- Lançamentos Submarinos. *Saneamento*, Rio de Janeiro, n^o46, 1973.
- Mahon, C.R. & Manuselis Jr. G. Enterobacteriaceae. In Mahon, C.R. & Manuselis Jr. G. (eds.), *Textbook of Diagnostic Microbiology*. W.B. Saunders Company, cap. 16, 448 p., Philadelphia, 1995.
- Maturin, L.J. & Peeler, J.T. Aerobic Plate Count. In U.S. Food and Drugs Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. *Bacteriological Analytical Manual online*.

- FDA/CFSAN. Sept 2002, disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~bam/bam-3.html>. acesso em 25/11/2002.
- McDougald D.; Rice S.A.; Weichart, D. & Kjelleberg, S. Nonculturability: adaptation or debilitation?. *FEMS Microbiology Ecology*, Elsevier science, v.25, p.1-9, 1998.
- Mehlman, I.J.; Andrews, W.H. & Wentz, B.A. Coliform bacteria *In Bacteriological Analytical Manual*, 6th ed., p. 5.01 – 5.07. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984.
- Melo, M.T.D.; Saker-Sampaio, S. & Vieira, R.H.S.F Avaliação da poluição orgânica no estuário do Rio Ceará (Fortaleza – Ceará – Brasil). *Caatinga*, v.7, p.207-219, 1990.
- Melo, M.T.D.; Vieira, R.H.S.F.; Saker-Sampaio, S. & Hofer, E. Coliforms and *salmonella* in seawater near to domestic sewage sources in Fortaleza – Ceará – Brazil. *Microbiologia SEM*, Barcelona, v.13, p.463-470, 1997.
- Miranda, M.B.B.& Guzenski, J. Cultivo larval da ostra do mangue, *Cassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) em diferentes condições de temperatura, salinidade e densidade. *Arquivos de Ciências do Mar*, Fortaleza, nº. 32, p. 73-84, 1999.
- Mota, S. *Preservação dos recursos hídricos*. ABES (Associação Brasileira Dos Engenheiros Sanitaristas). 222p., Rio de Janeiro, 1988.
- Mota, J.C. & Tucci, C.E.M. Simulation of the urbanization effect in flow. *Journal Hidrological Sciences*, v. 29, p. 131-147, 1994.
- Munro, P.M.; Laumond, F.M. & Gauthier, M.J. A previous growth of enteric bacteria on a salted medium increases their survival in seawater. *Letters of Applied Microbiology*, v.4, p.121-124, 1987.
- Munro, P.M.; Gauthier, M.J.; Breittmayer, V.A. & Bongiovani, J. Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 55, nº8, p. 2017-2024, 1989.
- Nataro, J.P. & Kaper, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. American Society for Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, nº1, p. 142-201, 1998.
- Ohtomo, R. & Saito, M. Increase in the culturable cell number of *Escherichia coli* during recovery from saline stress: possible implication for resuscitation from the VBNC state. *Microbial Ecology*, Springer-Verlag, New York, 2001.

- Pommepuy, M.; Butin, M.; Derrien, A.; Gourmelon, M.; Colwell, R.R. & Cormier, M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.42, p.4621-4626, 1996.
- Roszak, D.B. & Colwell, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews*, Maryland, v.51, n°3, p.365-379, 1987.
- Rozen, Y. & Belkin, S. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 725, p. 1-17, 2001.
- Santos, E. de A. *Correlação entre parâmetros microbiológicos, químicos e físicos em água do mar poluída na zona litorânea do Rio de Janeiro*. (Tese de Mestrado), Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 125p., Rio de Janeiro, 1980
- Silva, L.L. *Ecologia: Manejo de Áreas Silvestres*. Fundação Nacional do Meio Ambiente (ed.), 352 p., Santa Maria, 1996.
- Sinton, L.W.; Finlay, R.K. & Lynch, P.A. Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, n°8, p.3605-3613, 1999.
- Toranzos, G.A. & McFeters, G.A. Detection of indicator microorganism in environmental freshwaters and drinking waters. p. 184-194, *In Hurst, C.J. et al. (eds). Manual of Environmental Microbiology*, Washington, 1997.
- Trousselier, M.; Bonnefont, J.L.; Courtier, C.; Derrien, A.; Dupray, E.; Gauthier, M.; Gourmelon, M.; Joux, F.; Lebaron, P.; Martin, Y. & Pommepuy, M. Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater. *Oceanologica Acta*, Paris, v. 21, n°6, p. 965-981, 1998.
- Vieira, R.H.S.F. & Façanha, S.H.F. Parâmetros físicos-químicos e pesquisa de coliformes totais, fecais e *Vibrio parahemolyticus* na águas do Rio Cocó. *Ciências Agrônômicas*, Fortaleza, v. 25, n°1/2, p. 24-31, 1994.
- Vieira, R.H.S.F.; Silva, P.R.G.; Lehugeur, L.G.O. & Sousa, O.V. Colimetria da água da praia da Barra do Ceará – Fortaleza – Ceará. *Arquivo de Ciências do Mar*, Fortaleza, v.32, p.119-122, 1999.
- Vieira, R.H.S.F.; Silva, A.I.M.; Sousa, O.V.S.; Hofer, E.; Vieira, G.H.F.; Sampaio, S.S. & Lima, E.A. Análise experimental sobre a viabilidade de *Escherichia coli* em água do mar. *Arquivos de Ciências do Mar*, Fortaleza, v.34, p.43-48, 2001.

Xu, H.S.; Roberts, N.; Singleton F.L.; Atwell, R.W.; Grimes D.J.; & Colwell, R.R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, New York, v.8, p. 313-323, 1982.