

EFEITO DA LUZ SOLAR SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE Escherichia coli, EM AREIA DE PRAIA

Effect of sun light on the survival of *Escherichia coli* in beach sand

Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira¹, Daniel Rodrigues dos Santos², Mônica Pimenta de Novaes Castelo Branco³, Silvana Saker Sampaio⁴, Oscarina Viana de Sousa⁵

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a sobrevivência de uma cepa de *Escherichia coli* resistente ao ácido nalidíxico (AN), inoculada em amostras de areia de praia, expostas à luz solar. O trabalho foi realizado em seis microcosmos: (a) Experimento – areia esterilizada + salina estéril + *E. coli*; (b) Controle – areia não esterilizada + salina estéril + *E. coli*; e (c) Controle Branco – areia esterilizada + salina estéril, sendo três expostos à luz solar e três, mantidos no escuro, protegidos da luz solar. Dos microcosmos experimentais depois de decorridas 48 h de exposição à luz solar nenhuma cepa de *E. coli* foi recuperada, ratificando a assertiva de que a irradiação ultravioleta é letal para a célula viável. As amostras de areia inoculada não foram favoráveis ao crescimento do caldo de cultura de *E. coli* quando expostas aos raios solares.

Palavras-chaves: areia de praia, sobrevivência, recuperação, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

This research work was aimed at appraising the survival of a *Escherichia coli*'s strain as resistant to the nalidixic acid, through inoculation into sand samples exposed to sun light. The experimental layout was designed in six microcosmos, namely: (a) working experiment – sterilized sand plus sterile saline plus *E. coli*; (b) control experiment – non-sterilized sand plus sterile saline plus *E. coli*; (c) blank control – sterilized sand + sterile saline, with three of them being exposed to sun light and three kept in the dark, protected against sun light's influence. Considering the experimental microcosmos and after a 48-hour period of sun light exposition had elapsed, no *E. coli* strain was recovered what bears out the fact that the ultraviolet irradiation is lethal to a viable cell. The samples from inoculated sand were not found to be favorable to the growth of *E. coli* cultivation broth when exposed to sun light.

Keywords: beach sand, survival, recovery, *Escherichia coli*.

¹ Professor do Departamento de Engenharia de Pesca e pesquisador do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. Bolsista de produtividade do CNPq. E-mail: reginevieira@terra.com.br

² Estudante de Graduação do Curso de Ciências Ambientais, Universidade Federal do Ceará.

³ Pesquisador do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. E-mail: castelobranco.monica@gmail.com

⁴ Professor do Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará. E-mail: sakersil@yahoo.com.br

⁵ Professor do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. E-mail: oscarinavs@ufc.br

INTRODUÇÃO

Microrganismos têm sido frequentemente isolados de areias de praias e muitos deles reconhecidos como patógenos potenciais para seres humanos. Alguns fatores facilitam a sobrevivência e a dispersão desses patógenos na costa marinha, incluindo a natureza da praia, as marés, a presença de esgotos sanitários, a estação do ano, a presença de animais e o número de frequentadores (WHO, 2003). Quanto tempo uma bactéria fecal pode sobreviver em areias de praias ensolaradas sob condições normais é uma pergunta que aguarda resposta, considerando que a incidência de radiação ultravioleta consiste em fator limitante da permanência de bactérias em solos superficiais. Espera-se que alguns tipos de solo facilitem a sobrevivência da bactéria, sobretudo, porque dessa ligação e das fontes nutricionais em oferta dependerão sua sobrevivência.

Nesse contexto, há muito tempo foi reconhecida a necessidade de se estabelecer padrões microbiológicos para corpos de água, sobretudo, quando foi descoberto que a água contaminada por dejetos poderia transmitir inúmeras doenças tais como: shigeloses, febre tifoide, amebíase e cólera, dentre outras (Fujioka, 1997). O início desse estudo foi liderado por Escherich quando, em 1885, determinou que as bactérias coliformes, das quais *Escherichia coli* é uma das espécies, eram numerosas e sempre detectadas em fezes e esgoto. Diversos países utilizam os coliformes como um dos principais padrões para averiguar a qualidade microbiológica de quaisquer águas, doces ou marinhas, usadas para contato primário. O Brasil adota para águas marinhas além da quantificação de coliformes termotolerantes, a de *E. coli* e a de enterococos (BRASIL, 2000), sendo que, no Artigo 8 dessa Resolução, há uma recomendação aos órgãos ambientais de avaliação parasitológica e microbiológica da areia para futuras padronizações.

Aliados ao risco sanitário direto da presença de bactérias entéricas em áreas costeiras estão a qualidade dessas bactérias como reservatórios de resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos e o potencial de transferência desse marco genético de resistência entre as bactérias no ambiente. O ácido nalidíxico (AN) é uma quinolona que apresenta ação antibacteriana somente sobre bastonetes Gram negativos entéricos, por exemplo, *Escherichia coli* (Tavares, 2007). A resistência de *E. coli* ao AN resulta da interferência dos derivados quinolônicos na síntese do DNA bacteriano, por inibição da ação da DNA girase e da topoisomerase, enzimas que promovem o enovelamento e abertura das fitas de DNA, visando

sua ocupação em um menor espaço na célula (Alterthum, 2008). A resistência às fluoroquinolonas é exclusivamente de origem cromossômica, não tendo sido nunca relatada resistência plasmidial o que é contestado por Alterthum (2008) pois plasmídios foram observados albergando genes de resistência às quinolonas.

A cidade de Fortaleza, dada a sua posição geográfica, apresenta índices elevados de insolação durante o ano inteiro, característica que é explorada comercialmente como fator de atração para turistas que vêm aproveitar suas praias. Entretanto, a elevada frequência de usuários, a presença de animais domésticos nas areias e a descarga de fontes difusas de contaminação, como galerias pluviais, levam as praias a uma condição sanitária precária e conseqüentes riscos à saúde. Essa pesquisa tem como objetivo avaliar a sobrevivência de bactérias *E. coli*, com um marco de resistência ao AN, em areia de praia exposta à luz solar.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do substrato

Amostras do substrato, constituído de areia seca de praia, foram coletadas manualmente na Praia Meireles, em Fortaleza/CE (03°43'28"S-38°29'29"W), acondicionadas em sacos plásticos, etiquetadas e transportadas para o Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC). O material coletado foi dividido em duas porções: uma destinada às análises morfológica e mineralógica e a outra, às análises microbiológicas.

Análise do substrato

No Laboratório de Oceanografia Geológica do LABOMAR-UFC, as amostras foram lavadas com água destilada para a retirada completa de sais solúveis e secas em estufa a uma temperatura aproximada de 60°C, sendo posteriormente analisadas quanto à granulometria, mineralogia e teores de carbonato de cálcio, matéria orgânica e umidade natural do solo.

A análise granulométrica foi realizada por peneiramento mecânico de 100 g da amostra. A classificação do substrato baseou-se no peso de cada fração retida no jogo de peneiras de diâmetros variados.

A composição mineralógica da amostra foi determinada por identificação visual em microscópio estereoscópico (Bel Photonics - XLT), acoplado com câmera de vídeo (Rohs MTV 63SS10HP), e por aná-

lise comparativa na tabela do grau de arredondamento e esfericidade da areia (Krumbein & Sloss, 1963 *apud* Suguio, 1973).

O teor de carbonato de cálcio foi determinado pelo método do calcímetro de Bernard (Lamas *et al.*, 2005), baseado na reação entre o ácido clorídrico e o carbonato de cálcio (CaCO_3), presente na amostra, com liberação de gás carbônico (CO_2). Para determinação da matéria orgânica foi usado o método da calcinação (*loss on ignition*), com queima da amostra em mufla a 450°C por 2 h (Davies, 1974). A umidade natural do substrato foi quantificada por diferença de peso entre uma determinada quantidade de amostra em estado natural e após o processo de secagem em estufa a 60°C por 48 h, segundo a metodologia de Reichardt (1985 *apud* Paixão, 2005).

Cultura de *Escherichia coli*

Cultura de *E. coli* resistente ao ácido nalidíxico (AN), oriunda da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do LABOMAR-UFC, isolada de água do mar coletada nas proximidades do emissário submarino em Fortaleza, Ceará, foi inoculada em 200 mL de solução salina estéril (0,85% de NaCl) e agitada em um agitador Vortex (Phoenix) por 20 minutos. O homogenato foi ajustado pela escala McFarland até que o número de células ficasse igual ao tubo 0,5 (10^8 Unidades Formadoras de Colônias - UFC), conforme Mahon & Manuselis (1995).

Porções de 1.000 g de areia de praia seca foram lavadas com uma solução de ácido clorídrico a 10%, sob agitação manual, com intervalos de repouso a cada 10 minutos, durante 2 h. Em seguida, o material foi lavado em água corrente por cinco vezes a fim de eliminar o ácido e submetido a uma série de três autoclavagens (121°C/30 min). Por fim a areia estéril foi levada à estufa de secagem a 100°C por 24 h.

As amostras de areia estéril foram estocadas em quatro caixas de alumínio esterilizadas. Simultaneamente, duas amostras de areia sem esterilização foram estocadas em duas caixas de alumínio, também previamente esterilizadas. Assim, seis microcosmos foram preparados: (a) *Experimento* – areia esterilizada + 100 mL solução salina esterilizada + 100 mL do homogenato de *E. coli* resistente a AN; (b) *Controle* – areia não esterilizada + 100 mL solução salina esterilizada + 100 mL do homogenato de *E. coli* resistente a AN; (c) *Controle Branco* – areia esterilizada + 200 mL solução salina esterilizada, sendo que três foram expostos à luz solar e os outros três, mantidos no escuro, protegidos da luz solar por um tecido de cor preta.

Cepas de *E. coli* resistentes ao ácido nalidíxico

Primeiro experimento: no tempo zero de estocagem foram retirados 25 g de areia de cada caixa e imediatamente realizados os testes para confirmação da presença da bactéria *E. coli* resistente ao AN. Para tanto foram homogeneizados 25 g de areia de cada caixa seguindo a orientação de Mehlman *et al.* (1984) e diluído em 225 mL de solução salina estéril (0,85% de NaCl). Do homogenato foram feitas diluições até 10^{-3} , e alíquotas de cada diluição foram semeadas por esgotamento em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB-Difco). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após o tempo de incubação, de cada placa foram isoladas três colônias e delas feitos esfregaços em lâminas, coradas pelo método de Gram e observadas em microscópio. Depois de confirmadas como bastonetes Gram negativos, inóculos foram transferidos para tubos com Ágar Triptona de Soja (TSA-Difco) inclinados e incubados a 37°C por 24 h. Após esse tempo, as cepas de cada tubo foram inoculadas em Ágar SIM, Caldo VM VP e Ágar Citrato, todos de marca Difco, para comprovação da espécie *E. coli*. Posteriormente, de cada cepa crescida e confirmada como *E. coli* foi feito o teste de susceptibilidade ao AN, de acordo com CLSI (2013), em que para ser sensível o halo deve ser maior ou igual a 19 mm; para ser classificada como intermediária, o halo deve ficar entre 14 e 18 mm, e para ser considerada resistente, o halo deve ser igual ou inferior a 13 mm.

Segundo experimento: O procedimento descrito acima foi repetido. Dessa feita, a contagem de células viáveis a 35°C \pm 2°C foi feita no tempo zero e a cada 48 h. Além disso, colônias típicas de *E. coli* em Ágar EMB (n = 3) eram submetidas aos testes do IMVIC e ao teste de susceptibilidade ao AN (CLSI, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O arcabouço sedimentar do substrato analisado (areia de praia) foi caracterizado por apresentar 0,13% de lama, 0,01% de cascalho e predomínio de grãos de quartzo (99,86%), variando de subarredondados a arredondados, seguidos por grãos de minerais pesados (e.g. ilmenita, turmalina), fragmentos de conchas e rara matéria orgânica (Figura 1). Com base na frequência e no tamanho das partículas, mostrando predomínio de grãos de areia fina com diâmetro variando de 2,0 a 2,5 μ , o substrato foi classificado através do diagrama triangular de Shepard (1954), mostrado na Figura 2. O substrato analisado

apresentou 7,6% de carbonato de cálcio (CaCO_3), correspondendo a fragmentos de conchas de animais marinhos e baixo teor (0,2%) de matéria orgânica, possivelmente, relacionada aos moluscos que estiveram abrigados nas conchas identificadas, misturadas às amostras de areia. A umidade natural do substrato foi de 0,69%.

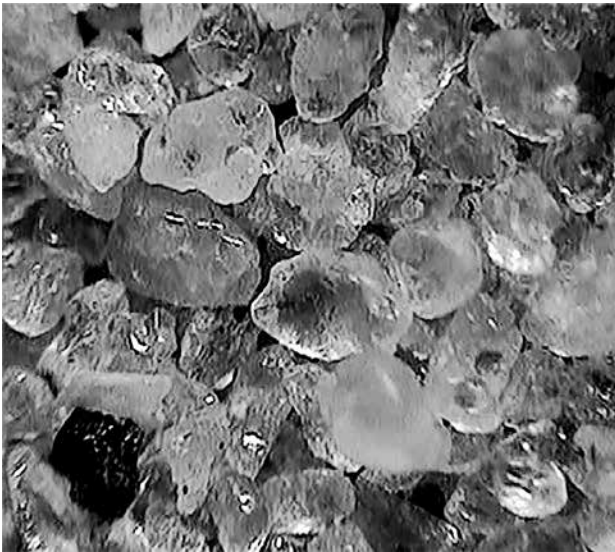


Figura 1 - Microfotografia em microscópio estereoscópico (Bel Photonics XLT) com câmera de vídeo (Rohs MTV 63SS10HP) do substrato (areia de praia) coletado na Praia Meireles, em Fortaleza, Ceará, utilizado para inoculação de cultura de *Escherichia coli* resistente ao ácido nalidíxico.

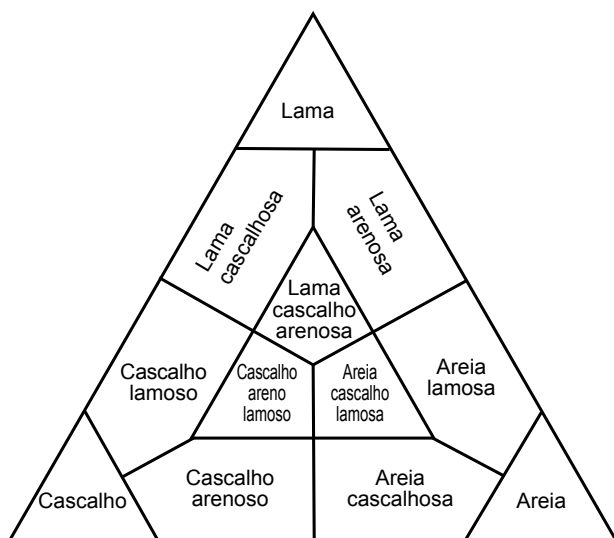


Figura 2 - Diagrama triangular de classificação segundo Shepard (1954, apud Suguio 1973) do substrato (areia de praia) coletado na Praia Meireles, em Fortaleza, Ceará, utilizado para inoculação de cultura de *Escherichia coli* resistente ao ácido nalidíxico.

O fato de estar classificado no grupo das areias condiciona o substrato à presença reduzida de nutrientes, o que desfavorece a multiplicação das bactérias. A ausência de matéria orgânica limita o crescimento da *E. coli*: Na verdade, o mecanismo pelo qual as bactérias colonizam a areia da praia é pouco entendido, pois sua ocorrência pode assumir forma passiva, via fezes de animal, deposição de detritos na costa ou concentração na areia, e ativa, por crescimento devido a condições adequadas ou recuperação de um estado prévio de não culturável (Whitman & Nevers, 2003).

Um dos principais fatores que afetam a atividade microbiana na zona litorânea se refere à disponibilidade de areia para que os microrganismos possam multiplicar-se, pois é na superfície das partículas de solo que seu crescimento é mais intenso (Madigan *et al.*, 2010). Mesmo um pequeno agregado desse material pode conter vários microambientes e, desse modo, permitir o crescimento de diferentes tipos de micro-organismos, a partir da disponibilidade de recursos alimentares, tais como matéria orgânica, água, fósforo e nitrogênio. Pinto & Oliveira (2011) afirmam que os resultados de pesquisas realizadas nesse ambiente comumente revelam maiores densidades de microrganismos em areias de praias do que no mar adjacente, devido ao fato de as bactérias aderirem às partículas do sedimento e assim se protegerem dos efeitos prejudiciais das radiações da luz solar, o que não acontece com aquelas que ficam livres na água (Aulicino *et al.*, 1985; Sato *et al.*, 2005).

De uma maneira geral, as densidades de microrganismos são maiores em areia seca do que em areia úmida, afirmação sustentada por Vieira *et al.* (2002), que obtiveram resultados semelhantes, ao compararem o grau de contaminação de amostras de areias úmidas e secas de três praias de Fortaleza, Ceará.

No primeiro experimento, após 24 h de estocagem, 45 colônias de *E. coli* resistentes ao AN foram isoladas dos microcosmos (do exposto à luz solar e do mantido no escuro). Nos microcosmos referidos como Controle, além de *E. coli* também foram isoladas cepas de *Enterobacter spp.* Vieira *et al.* (2001), pesquisando bactérias entéricas em 103 amostras de areias úmidas e secas das praias do Mucuripe, Futuro e Caça e Pesca em Fortaleza, Ceará, identificaram a espécie *E. coli* ($n = 46$) além de representantes dos gêneros *Enterobacter spp.* ($n = 53$) e *Citrobacter spp.* ($n = 4$), os quais são comuns em fezes, embora *Enterobacter spp.* possam também ser isolados de amostras do solo (Grimont & Grimont, 2006).

Após 48 h de exposição à luz solar, os microcosmos Experimento e Controle já não apresentavam

mais crescimento das bactérias, indicando que nesse tempo, as cepas expostas ao Sol não eram mais cultiváveis. Contrariamente, nos microcosmos Experimento e Controle mantidos no escuro, protegidos da luz solar, as cepas se revelaram viáveis até mais de 72 h, tempo de encerramento do experimento. Por outro lado observa-se que não houve crescimento bacteriano no microcosmos Controle Branco. (Tabela I, Figura 3).

Alkan *et al.* (1995) afirmam que o efeito da radiação solar sobre bactérias entéricas tem sido avaliado em razão dos questionamentos sobre o impacto dos despejos de esgotos em águas marinhas, fato comum em cidades litorâneas. Pesquisas mostraram o efeito deletério da radiação UV sobre células de *E. coli* resistentes ao AN introduzidas por irrigação sobre folhagens e solo (Wood *et al.*, 2008 e 2010).

No segundo experimento, a partir de 48 h, as amostras de areia dos microcosmos Experimento e Controle expostas à luz solar já não apresentavam

contagens de *E. coli*, enquanto que nos microcosmos correspondentes, mantidos no escuro protegidos da luz solar, as contagens foram de $15,7 \times 10^3$ UFC/g e $>250 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente. Embora a maioria das cepas de *E. coli* não seja patogênica, essa bactéria pode disseminar doenças em diferentes órgãos do trato intestinal (Pinto & Oliveira, 2011), daí a importância da determinação de sua sobrevivência, uma vez que seu isolamento de areias das praias de Fortaleza é frequente (Vieira *et al.*, 2001 e 2002; Castro *et al.*, 2006).

Ao longo do experimento foram recuperadas cepas de *E. coli* dos tratamentos para verificar a culturabilidade das células e a estabilidade do marco de resistência. Todas as estirpes recuperadas e isoladas foram positivamente identificadas como *E. coli* e apresentaram resistência ao AN até o final do experimento, indicando que a exposição à radiação solar não apresentou efeito mutagênico nem capacidade de silenciar a expressão do gene de resistência.

Tabela I - Contagens de *Escherichia coli* resistente ao ácido nalidíxico (UFC/g), inoculada no substrato (areia de praia) coletado na Praia Meireles, em Fortaleza, Ceará, versus tempo de sobrevivência.

Microcosmos	Tempo (h)	Contagens (UFC/g)	
		Expostas à luz solar	Protegidas da luz solar
Experimento	0	10^8	10^8
Controle		10^8	10^8
Controle Branco		0	0
Experimento	48	0	51×10^3
Controle		44×10^1	$> 250 \times 10^3$
Controle Branco		0	0
Experimento	72	0	$15,7 \times 10^3$
Controle		0	$> 250 \times 10^3$
Controle Branco		0	0

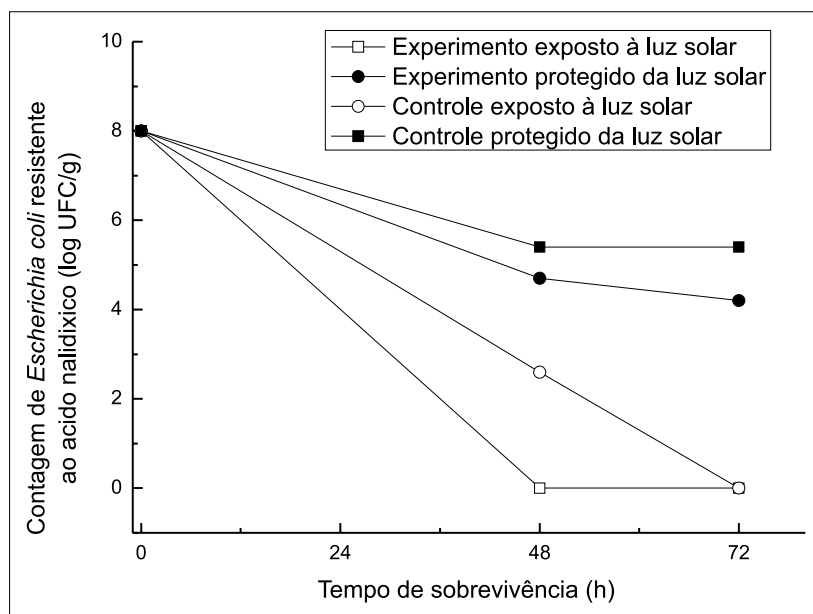


Figura 3 - Contagens de *Escherichia coli* resistente ao ácido nalidíxico (log UFC/g), inoculada no substrato (areia de praia) coletado na Praia Meireles, em Fortaleza, Ceará, versus o tempo de sobrevivência.

CONCLUSÕES

As amostras de areia inoculadas não foram favoráveis ao crescimento do caldo de cultura de *Escherichia coli* quando expostas aos raios solares. Dos microcosmos experimentais não foram recuperadas cepas de *E. coli* além de 48 h, ratificando a assertiva de que a irradiação ultravioleta é letal para a célula viável.

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 Res.*, v.29, p.2071-2081, 1995.

Alterthum, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência, in Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds.), *Microbiologia*. Editora Atheneu, 5ª edição, 759 p., São Paulo, 2008.

Aulicino, F.A.; Volterra, L. & Donati, G. Faecal contamination of shore-line sands. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, v.61, n.10, p.1469-1475, 1985.

BRASIL. Resolução CONAMA Nº 274, de 29 de novembro de 2000. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasília, 2000.

Castro, H.M.P.; Vieira, R.H.S.F.; Fonteles-Filho, A.A.; Albuquerque, W.F.; & Hofer, E. Efeito da radiação solar na sobrevivência de *Escherichia coli*. *Arq. Ciên. Mar*, v.39, p.28-33, 2006.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 23rd Informational Supplement, v.33, n.1, p.1-105, 2013.

Davies, B.E. Loss-on-ignition as an estimate of soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, v.38, p.347-353, 1974.

Fujioka, R.S. Indicators of marine recreational water, p.176-183, in Hirst, C.J.; Knudsen, G.R.; McLnerney, M.J.; Stetzenbach, L.D. & Walter, M.V. (eds.), *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington, DC, 1997.

Grimont, F. & Grimont, P.A.D. The genus *Enterobacter*, p.197-214, in Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K-H. & Stackebrandt, E. (eds.), *The Prokaryotes, Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, Springer-Verlag, 2nd edition, New York, 2006.

Lamas, F.; Irigaray, C.; Oteo, C. & Chacón, J. Selection of

the most appropriate method to determine the carbonate content for engineering purposes with particular regard to marls. *Engineer. Geol.*, v.81, n.1, p.32-41, 2005.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Dunlap, P.V. & Clark, D.P. *Microbiologia de Brock*. Artmed, 12ª edição, 1160 p., 2010.

Mahon, C.R. & Manuselis, J.R.G. *Textbook of diagnostic microbiology*. W.B. Saunders Company, 1134 p., Philadelphia, 1995.

Mehlman, I.J.; Andrews, W.H. & Wentz, B.A. Coliform bacteria, in *Bacteriological Analytical Manual*, AOAC, 6th edition, p. 5.01-5.07, Arlington, 1984.

Paixão, M.S.G. *Análise da acurácia das estimativas de posicionamento do nível freático e dos teores de umidade do solo com o emprego dos métodos de sísmica de refração rasa e geo-radar a partir de um estudo no Campus da USP*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, Universidade de São Paulo, 111 p., 2005.

Pinto, A.B. & Oliveira, A.J.F.C. Diversidade de microrganismos utilizados na avaliação da contaminação fecal de areias de praias recreacionais marinhas: estado atual do conhecimento e perspectivas. *O Mundo da Saúde*, São Paulo, v.35, p.105-114, 2011.

Sato, M.I.Z.; Bari, M.D.; Lamparelli, C.C.; Truzzi, A.C.; Coelho, M.C.L.S. & Hachich, E.M. Sanitary quality of sands from marine recreational beaches of São Paulo. *Braz. J. Microbiol.*, v.36, p.21-26, 2005.

Suguio, K. *Introdução à sedimentologia*. Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1973.

Tavares, W. *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico*. Editora Atheneu, 585 p., São Paulo, 2007.

Vieira, R.H.S.F.; Catter, K.M.; Saker-Sampaio, S.; Rodrigues, D.P.; Theophilo, G.N.D.; & Fonteles-Filho, A.A. The stormwater drain system as a pollution vector of the seashore in Fortaleza (Ceará State, Brazil). *Arq. Ciên. Mar*, v.33, p.294-298, 2002.

Vieira, R.H.S.F.; Rodrigues, D.P.; Menezes, E.A.; Evangelista, N.S.S.; Reis, E.M.F.; Barreto, L.M. & Gonçalves, F.A. Microbial contamination of sand from major beaches in Fortaleza, Ceará State, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.32, p.77-80, 2001.

Whitman, R.L. & Nevers, M.B. Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of a Lake Michigan beach. *Appl. Environ. Microb.*, v.69, n. 9, p.5555-5562, 2003.

WHO. *Guidelines for Safe Recreational Water Environments. v. 1. Coastal and Fresh Waters*. World Health Organization, Geneva, 2003.

Wood, J.D.; Bezanson, G.S.; Gordon, R.J. & Jamieson, R. Population dynamics of *Escherichia coli* inoculated by irrigation into the phyllosphere of spinach grown

under commercial production conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, v.143, p.198-204, 2010.

Wood, J.D.; Gordon, R.; Bezanson, G.S. & Potter, G. *Natural disinfection of nalidixic acid resistant Escherichia coli in a spinach production system introduced by irrigation water*. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2008.