



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

RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli*
A DIFERENTES FATORES EM MEIO MARINHO

ANA ISABEL MOTA SILVA

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Fortaleza - Ceará
Dezembro / 2000



Prof.^a. Dr.^a. REGINE HELENA SILVA DOS FERNANDES VIEIRA
Orientadora

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Adjunto JOSÉ CALS GASPAR JUNIOR

Dr.^a. SILVANA SAKER SAMPAIO

VISTO:

Prof. LUIS PESSOA ARAGÃO
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof.^a. MARIA SELMA RIBEIRO VIANA
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S578r Silva, Ana Isabel Mota.
Resistência de Cepas de Escherichia com a diferentes fatores em meio marinho / Ana Isabel Mota Silva. – 2000.
30 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2000.
Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

1. Engenharia de Pesca. 2. Cepas - Meio Marinho. I. Título.

CDD 639.2

AGRADECIMENTOS

A Deus que esteve sempre me dando coragem e força para vencer todos os obstáculos pelos quais passei.

Aos meus irmãos, pela força e estímulo fornecidos em todos os momentos.

À Professora Silvana Saker pela valiosa colaboração dando sugestões e pelas correções feitas.

À Professora Maria Elisabeth de Araújo, pela compreensão e ajuda para a realização deste trabalho.

À Professora Maria Selma Ribeiro Viana, pela grande amizade e colaboração essenciais para a realização da minha graduação.

Ao Dr. Ernesto Hofer, pelas suas valiosas sugestões e esclarecimentos durante os experimentos.

Ao Departamento de Engenharia de Pesca e a todos os professores e funcionários, em especial Sr. Edilson e Lenir.

Ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) pela disponibilidade de suas instalações.

Aos colegas do grupo PET-PESCA, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Alessandra, Charles, Dioniso, Helaine, Marcelo, Márcio e Roberto, pela confiança, carinho e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Pescado do LABOMAR, Susy, Flávia, Gleire, Norma, Marilza, Janisi, Elenice e Dona Zuíla.

À minha querida amiga Oscarina, pelos esclarecimentos que facilitaram a minha vida no laboratório.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Verdes mares bravios
da minha terra natal,
aqueles que impressionaram
ao escritor Alencar.
Já não és tão verde assim
e nem tão lindo também.
Esgotos escorrem pretos
sujando as tuas águas.
Já não escondes as mágoas
dos poetas de tua terra.
Nem gritas se balançando.
Estás sim, agonizando
com toda poluição
que os homens te impõem.
Esgotos te cortam a vida
já não és águas queridas.
Até mesmo os amores
te cantam com dissabores.
És sujeira na cidade
e toda a infelicidade
mora em teu coração.

Precisamos de ação
para limpar o teu leito
e te dar de volta o cheiro
de alga, de peixe e sal.

Mares bravios da minha terra natal.
Vou fazer-te um carnaval.
E te dar de novo o sal
que perdeste ao longo do tempo.
Só tenho um pensamento
é fazer-te um belo templo
para que os jovens te adorem,
para que em ti, poetas chorem
cantando amores perdidos.
Verás que a mares bravios voltarás.
E se tiver no Ceará
outro Alencar moderno
te fará de novo eterno
para o meu e o teu bem.
Que tudo aconteça, Amém.

Verdes Mares Bravios ...

Regine Limaverde

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1 – Material	4
2.1.1 – Coleta das Amostras	4
2.2 – Métodos	6
2.2.1 – Isolamento da Bactéria	6
2.2.1.1 – Prova Presuntiva	6
2.2.1.2 – Prova Confirmatória	7
2.2.1.3 – Prova Completa	7
2.2.1.4 – Provas Bioquímicas	7
2.2.1.4.1 – Prova do Indol em Meio SIM	8
2.2.1.4.2 – Prova do VM	8
2.2.1.4.3 – Prova do VP	8
2.2.1.4.4. – Prova do Citrato	9
2.2.2 – Colimetria da Água do Mar	9
2.2.3 – Preparação da Amostra de Água do mar	9
2.2.4 – Preparação do Inóculo	9
2.2.5 – Contagem de <i>Escherichia coli</i>	10
2.2.6 – Contagem Padrão em Placas - CPP	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4. CONCLUSÕES	18
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01- Ponto de coleta da água do rio Cocó para isolamento de <i>Escherichia coli</i> , próximo à favela do Lagamar, Fortaleza-CE.	4
Figura 02- Fluxograma para identificação de <i>Escherichia coli</i> para as amostras de água coletadas na praia do Mucuripe em Fortaleza-CE.	5
Figura 03- Ponto de coleta da água do mar utilizada no experimento, na praia do Mucuripe, Fortaleza-CE.	6
Figura 04- Fluxograma do método de Contagem Padrão em Placas (CPP) aplicado para as contagens de <i>Escherichia coli</i> inoculadas nas temperaturas de 37°C e 44,5 °C em amostras de água do mar da praia do Mucuripe em Fortaleza-CE.	11
Figura 05- Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>Escherichia coli</i> , obtido através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas na água do mar em temperatura de 37° C.	14
Figura 06- Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>Escherichia coli</i> , obtido através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas na água do mar em temperatura de 44,5° C.	16

LISTA DE TABELA

	Página
Tabela I - Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>Escherichia coli</i> , obtido através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas na água do mar em temperatura de 37° C.	13
Tabela II - Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>Escherichia coli</i> , obtido através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas na água do mar em temperatura de 44,5° C.	15

RESUMO

É sabido na literatura científica que o ambiente marinho é tóxico para *Escherichia coli*. Este trabalho teve como propósito verificar a resistência e/ou crescimento da *Escherichia coli* em água do mar em diferentes temperaturas. Para a realização do experimento a bactéria *Escherichia coli* foi isolada de água do rio Cocó e água do mar foi coletada na praia do Mucuripe em Fortaleza. Foram realizados cinco experimentos. Os tempos testados foram de T_0 , ou seja no momento em que a bactéria foi inoculada na água do mar, até T_{168} , o equivalente a uma semana de cultivo. O teste de Contagem Padrão em Placas (CPP) foi o utilizado para a quantificação de bactéria sendo sempre acompanhado pelo teste do IMViC para se verificar se a cepa de *Escherichia coli* não havia sofrido nenhuma contaminação. Concluiu-se que às temperaturas de 37°C e $44,5^{\circ}\text{C}$ a bactéria apresentou uma redução em seu número de 31,6% e 31,4%, respectivamente. Verificou-se ainda que no intervalo de T_0 a T_{144} à temperatura de 37°C , a *Escherichia coli* obteve picos de crescimento, tendo sido o maior valor observado no T_2 com 8,30 ciclos logarítmicos e no intervalo de T_0 a T_{144} à temperatura de $44,5^{\circ}\text{C}$, a *Escherichia coli* obteve picos de crescimento, tendo sido o maior valor observado no T_1 com 8,32 ciclos logarítmicos. Por fim, no tempo T_{168} observou-se que a bactéria ainda resistia embora sem nenhum crescimento em ambas as temperaturas.

RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* A DIFERENTES FATORES EM MEIO MARINHO.

Ana Isabel Mota Silva

1 - INTRODUÇÃO

A água desempenha importante papel na saúde, por ser um excelente veículo para a transmissão de diversas doenças. Em cidades litorâneas, grande parte dos esgotos são jogados em rios tendo como receptor final o mar.

O mar recebe todos os anos enxurradas de esgotos despejados por emissários submarinos em suas águas. O resultado é o acúmulo de poluentes nas regiões costeiras, ao longo das quais vivem dois de cada três seres humanos (TOMMASI, 1998).

De acordo com FIGUEIRÔA *et al.* (1999), o levantamento das condições gerais de saneamento em cada município deve ser premente e compreender os sistemas de abastecimento de águas e esgotos. Enquanto que para PILONETTO & PILONETTO (1999), a análise microbiológica da água é de suma importância para diversos serviços, uma vez que reflete o padrão de qualidade da matéria-prima utilizada em inúmeros procedimentos, inclusive o do consumo humano.

Segundo DUARTE *et al.* (1996), as profundas desigualdades regionais no Brasil e a forte concentração de renda são responsáveis pelo aumento do deslocamento populacional da zona rural para a zona urbana, resultando assim em um aumento da produção de esgotos que são descarregados sem tratamento nos escassos corpos receptores, acelerando sua degradação, e sofrendo alterações severas com prejuízo à comunidade.

O indicador microbiológico de poluição fecal mais empregado é o grupo coliforme, que abrange um número de espécies de enterobactérias, incluídas nos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*.

O gênero *Escherichia* é assim denominado em homenagem a Theodor von Escherich, que o descreveu em 1885, como membro da microbiota do cólon, não prejudicial à saúde. Desde então, as bactérias desse grupo têm sido associadas com uma variedade de doenças e infecções.

A *Escherichia coli* caracteriza-se por apresentar-se como um bacilo curto, móvel ou imóvel, Gram-negativo, com muitas características semelhantes às salmonelas, diferenciando-se no entanto, pela sua capacidade de atacar a lactose e a sacarose, com produção de gás (HAYES, 1993).

O habitat natural da *Escherichia coli* é o trato intestinal dos animais de sangue quente, incluindo o homem. A temperatura ótima de crescimento está na faixa dos $36 \pm 1^\circ\text{C}$. 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. A glicose e outros carboidratos são fermentados com produção de piruvato, que é então convertido a ácido lático, acético e fórmico. Muitas cepas, especialmente aquelas isoladas dos tecidos extra-intestinais, possuem cápsulas ou microcápsulas polissacarídicas (BRENNER, 1984).

A *Escherichia coli* é um dos principais agentes causadores de infecções gastrointestinais, principalmente onde as condições sócio-econômicas são precárias e, por conseguinte, as regras de higiene são deficientes. A ingestão de alimentos e/ou águas contaminadas por esse microrganismo significa um possível perigo à Saúde Pública.

Por ser uma bactéria de origem fecal, a *Escherichia 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. A água do mar, devido a grande concentração de sais, pode funcionar como um fator limitante para o desenvolvimento da *Escherichia coli* aliado a outros fatores, tais como a temperatura.

Quanto a patogenicidade, a *Escherichia coli* pertencente a microbiota intestinal, torna-se patogênica quando localizada fora do intestino. Para se tornarem patogênicas, desenvolveram a habilidade de causar doenças gastrointestinais, urinárias e no sistema nervoso central na maioria das pessoas (JAMES & JAMES, 1998).

Segundo FERNANDES *et al.* (1996), a contaminação fecal é a causa principal da baixa qualidade da água de numerosos corpos aquáticos na região nordeste.

De acordo com HAGLER & HAGLER (1988), a *Escherichia 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.

Os esgotos são ricos em bactérias nocivas ao homem que, ao entrarem em contato com o mar, sofrem morte gradual (CHAMBERLIN & MITCHELL, 1978). Esse fato pode não ser verdade, pois há evidências da conservação da viabilidade de patógenos humanos dentro de ambientes aquáticos, apesar da incapacidade de serem cultivados (POMMEPUY *et al.*, 1992), permanecendo as células intactas, submetidas à morte gradual, podendo reter plasmídios associados à virulência (BYRD & COLWELL, 1990) e enteropatogenicidade (COLWELL *et al.*, 1985).

Segundo MARTINS *et al.* (1989), do ponto de vista da Saúde Pública, os aspectos sanitários devem ser enfocados estudando-se o comportamento dos indicadores de poluição de origem fecal, sendo os mais comumente utilizados os coliformes, principalmente o grupo dos coliformes termotolerantes e os estreptococos fecais.

O presente trabalho tem como objetivos: determinar a resistência de *Escherichia coli* isolada de água doce, inoculada em água do mar e incubada à temperatura ambiente ($\pm 30^{\circ}\text{C}$), através de contagens em temperaturas de 37°C e $44,5^{\circ}\text{C}$.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – MATERIAL

2.1.1 – Coleta das Amostras

Foram isoladas 05 (cinco) cepas de *Escherichia coli* a partir de água coletada no rio Cocó, em dias diferentes, nas imediações da favela Lagamar (Figura 01), no período de maio a agosto de 2000.



Figura 01 – Ponto de coleta da água no rio Cocó para o isolamento de *Escherichia coli*, próximo à favela do Lagamar, Fortaleza – CE.

A água do rio foi coletada em frasco de boca esmerilhada, previamente esterilizado, acondicionado em caixa térmica e transportada para o laboratório. O intervalo entre a coleta e o início do experimento não ultrapassou o limite de uma hora.

A bactéria foi isolada utilizando-se a técnica da fermentação em tubos múltiplos, que consiste em quatro etapas: prova presuntiva, prova

confirmatória, prova completa e prova bioquímica conforme ilustrado no fluxograma (Figura 02).

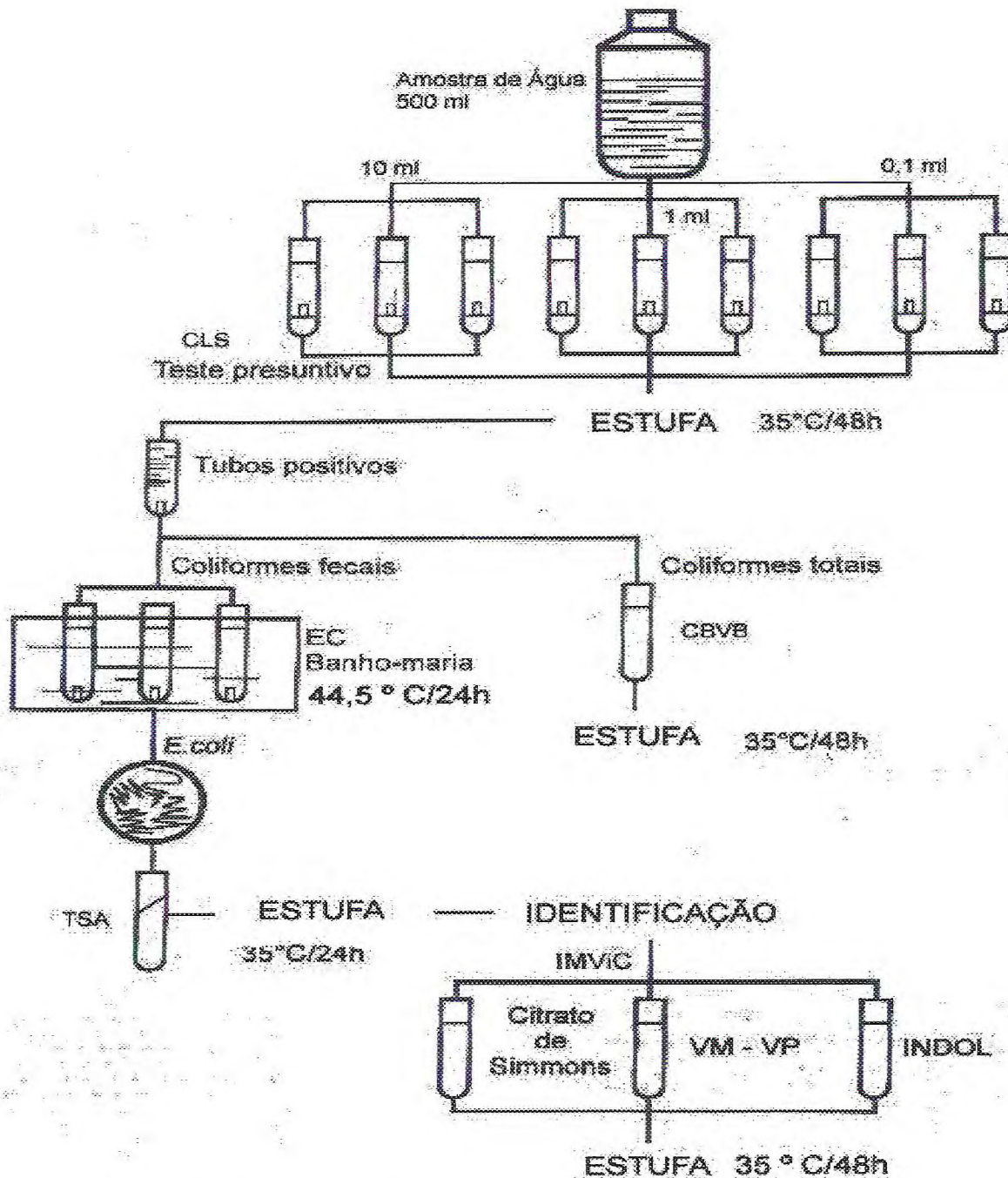


Figura 02 – Fluxograma para identificação de *Escherichia coli* para as amostras de água coletadas na praia do Mucuripe em Fortaleza-CE.

A água do mar utilizada no experimento foi coletada na praia do Mucuripe (Figura 03), também em frascos estéreis e transportados rapidamente para o laboratório.



Figura 03 – Ponto de coleta da água do mar utilizada no experimento, na praia do Mucuripe, Fortaleza – CE.

2.2 – MÉTODOS

2.2.1 – Isolamento da Bactéria

2.2.1.1 – Prova Presuntiva

Esta prova constou da inoculação de uma alíquota de 1 mL das amostras de água do rio Cocó, em tubos em triplicata, contendo o meio Caldo Lauril Sulfato (Difco) e tubos de Durham invertidos. Em seguida, foram incubados durante 48 horas a 35°C. Foram considerados positivos aqueles que apresentaram turvação e formação de bolhas de gás nos tubos de Durham.

2.2.1.2 – Prova Confirmatória

Para a prova de confirmação foram retirados inóculos com o auxílio de uma alça de níquel-cromo dos tubos positivos do teste anterior (Caldo Lauril Sulfato – Difco), para a realização da prova confirmatória. Esses inóculos foram semeados em caldo EC, e incubados em banho-maria Unitemp (FANEM) a 44,5°C por 24 horas.

Os tubos que apresentaram produção de gás e turvação foram considerados positivos para coliformes fecais.

2.2.1.3 – Prova Completa

A prova completa consistiu na semeadura, pelo método de estriamento, com alça de níquel-cromo, em Ágar Eosina Azul de Metileno – EMB (Merck), a partir do inóculo dos tubos que apresentaram resultados positivos no caldo EC. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas, para o isolamento de colônias típicas de *Escherichia coli*, caracterizadas por apresentarem diâmetro variando de 2 a 5 mm, centro negro com ou sem brilho metálico esverdeado (MEHLMAN *et al.*, 1984). Após o período de incubação as colônias isoladas foram estriadas em tubos de ensaio contendo Ágar Triptona Soja (TSA – Merck) inclinado e incubados em estufa, durante 24 horas a 35°C, para posterior utilização.

2.2.1.4 – Provas Bioquímicas

Para a identificação da bactéria fez-se uso de quatro provas bioquímicas: Indol em ágar SIM (Difco), Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) em caldo MR-VP (Difco) e ágar Citrato de Simmons (Difco). A essas quatro provas dá-se o nome de teste do IMViC (BIER, 1970).

Do crescimento em meio TSA, foram retirados inóculos a fim de serem semeados na bateria do IMViC e em seguida incubados a 35°C por 24 horas.

2.2.1.4.1 – Prova do Indol em Meio SIM

O meio SIM foi utilizado para verificar a motilidade do microrganismo isolado, sua capacidade de produção de H₂S e de indol (SIQUEIRA, 1995). A inoculação foi feita com agulha de níquel-cromo, procedendo-se uma picada no centro da coluna do meio de cultura. Após 24 horas de incubação, foram adicionados 0,2 mL do reativo de Kovac's (4-dimetilaminobenzaldeído) sobre o meio, a fim de se verificar a presença de indol (teste positivo) visualizado através da formação de um anel vermelho na superfície do meio.

2.2.1.4.2 – Prova de VM

A prova de VM testa a habilidade da *Escherichia coli* em produzir compostos ácidos, no final da fermentação da glicose. Para a realização da prova, após 24 horas de incubação, foram adicionadas ao meio, cinco gotas de uma solução de vermelho de metila. A positividade é comprovada com a mudança de cor do meio de amarela para vermelha.

2.2.1.4.3 – Prova do VP

A prova de VP tem como objetivo avaliar a habilidade de certos microrganismos em produzirem um composto neutro, acetilmetilcarbinol, durante a fermentação da glicose. A *Escherichia coli* apresenta-se negativa para esse teste. Para cada cultura, incubada durante 24 horas, foram adicionados 0,6 mL e 0,2 mL dos reagentes BARRIT I (α -naftol) e BARRIT II (hidróxido de potássio 40%), respectivamente, para cada mL do meio. O

aparecimento de uma coloração rósea a partir da superfície até a parte inferior do tubo indica um resultado positivo.

2.2.1.4.4 – Prova do Citrato

O Ágar Citrato é utilizado para caracterizar microrganismos capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A viragem da cor do meio de verde para azul indica resultado positivo. A bactéria em estudo apresenta resultado negativo para essa prova (SIQUEIRA, 1995).

Após a obtenção dos resultados dos testes do IMViC, as cepas foram identificadas e estriadas em ágar TSA.

2.2.2 – Colimetria da Água do Mar

A determinação da quantidade de coliformes fecais na água do mar antes de ser esterilizada foi feita através do método do COLILERT (CERQUEIRA & MARTINS, 1993).

2.2.3 – Preparação da Amostra de Água do Mar

A água do mar foi esterilizada por filtração, utilizando-se membrana Millipore 22 μ , com o auxílio de uma bomba de vácuo e distribuída em tubo estéril, na quantidade de 10 mL. Amostras da água do mar estéril foram plaqueadas para se comprovar a eficiência da filtração. A água do mar estéril foi usada como controle dos experimentos, os quais constaram de cinco repetições. Cada experimento era realizado com uma cepa de *E. coli* isolada de amostras coletadas no mesmo lugar, em diferentes dias.

2.2.4 – Preparação do Inóculo

Para a preparação do inóculo, foi retirada uma alçada do crescimento puro da bactéria em ágar TSA com alça de níquel-cromo e inoculada em caldo TSB (Caldo Triptona Soja), onde a bactéria cresceu a 35°C por 24 horas.

2.2.5 – Contagem de *Escherichia coli*

Para a contagem das bactérias crescidas em Plate Count Agar (PCA) fez-se uso do método de Contagem Padrão em Placas (CPP), segundo SILVA *et al.* (1997).

2.2.6 – Contagem Padrão em Placas – CPP

❖ **Primeiro passo:** diluições sucessivas a partir do tubo de TSB (10^{-1} a 10^{-9}) foram preparadas. A partir daí, porções de 1mL eram inoculadas em Agar Plate Count (PCA), e depois incubadas em temperaturas diferentes de 37 e 44,5°C por 48 horas, onde após esse tempo as placas eram contadas. Esse passo é necessário para se determinar a quantidade de bactérias inoculadas na água do mar em estudo e para, no caso de sobrevivência, acompanhar os números de suas células e relacioná-las com seu número inicial.

❖ **Segundo passo:** uma porção de 1 mL do crescimento em TSB foi inoculada no tubo de água do mar estéril. A partir da água do mar inoculada e incubada em temperatura ambiente, foram tomadas alíquotas em diferentes tempos. Assim, o tempo imediatamente após a inoculação foi chamado de T_0 e os posteriores por ordem, T_1 , T_2 , T_{24} , T_{48} , T_{72} , T_{120} , T_{144} e T_{168} . As amostras foram tomadas em duplicatas, semeadas em PCA e incubadas em diferentes temperaturas, de 37°C e 44,5°C (Figura 04).

Sempre que se tomava uma alíquota se verificava a pureza das cepas através do teste do IMViC e coloração de Gram. Essa era a garantia de que não estava havendo contaminação no material coletado.

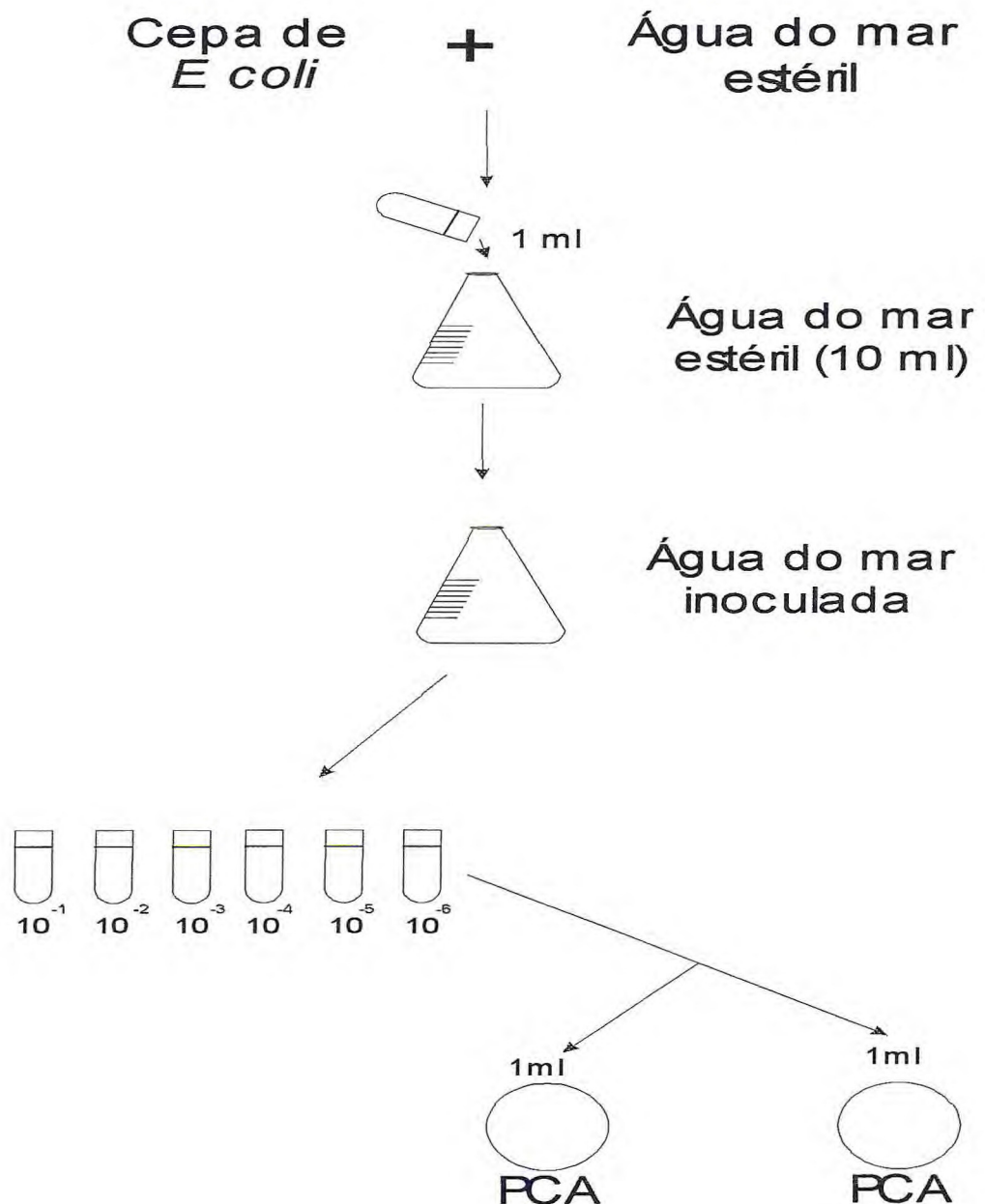


Figura 04 – Fluxograma do método de Contagem Padrão em Placas (CPP) aplicado para as contagens de *Escherichia coli* inoculadas nas temperaturas de 37°C e 44,5°C em amostras de água do mar da praia do Mucuripe em Fortaleza-CE.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 05 (cinco) experimentos apresentaram variações semelhantes no crescimento da *Escherichia coli* à temperatura de 37°C, ocorrendo uma redução de células quando da adição do inóculo em água do mar, seguindo-se de um grande crescimento da bactéria na primeira e segunda hora do início do experimento. O inóculo inicial de 1 bilhão de células/mL em 10 mL de água do mar, passou para 100 milhões de UFC/mL, em função de sua diluição. Neste tempo zero, imediatamente após a inoculação, foi feita uma contagem e a quantidade de células contadas em 37°C variou de 36 milhões (log = 7,56) a 64 milhões (log = 7,81) UFC/mL, significando uma redução de 36 a 64% (Tabela I , Figura 05).

Nos períodos subseqüentes (entre T₀ e T₂₄) observou-se novamente um decréscimo no número de bactérias. Os resultados seguintes mostraram-se repetitivos em relação aos tempos (oscilações com acréscimos e decréscimos), mas sempre com os picos de crescimento mais baixos em relação aos tempos de contagem usados anteriormente (Tabela I , Figura 05).

GRIMES *et al.* (1986) relatam a existência de enteropatogênicos que sobrevivem na água do mar por um longo período, atribuindo a isso o fato dessas bactérias, que são Gram-negativas, entrarem em estado de latência durante o qual, elas permanecem viáveis e potencialmente virulentas, contudo não culturáveis, quando emprega-se métodos bacteriológicos convencionais.

Altas quantidades de coliformes estão correlacionadas com altas concentrações de material orgânico. Conseqüentemente, não seria surpresa o fato de nessas águas, apesar de encontrarem-se esterilizadas, ter restado ainda material orgânico, que de certa maneira pode ser utilizado como substrato para o crescimento das bactérias. De acordo com MATES (1992), em um experimento com água do mar muito contaminada com coliformes, ocorreu um grande aumento de *Escherichia coli*, mesmo quando a água era estocada em baixas temperaturas, sugerindo que seu crescimento era resultado da grande quantidade de material orgânico presente na água.

A quantidade de coliformes fecais encontrada na amostra de água do mar foi de 2.300 UFC/ 100mL, o que caracteriza águas impróprias para balneabilidade (CONAMA, 1986). O fato dessa contagem ter mostrado um valor elevado de *Escherichia coli* possivelmente está relacionado a riqueza da amostra em material orgânico.

O fato de no final do experimento o número absoluto da bactéria ainda permanecer alto como foi visto na tabela I, não implica em afirmar que a redução foi pequena pois isto em média, em termos percentuais representou (33%), cifras bastante significativas.

Tabela I – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Escherichia coli*, obtido através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas na água do mar em temperatura de 37°C.

Tempo (h)	Amostra				
	1A	3A	1B	1D	2D
0	7,56	7,81	7,64	7,68	7,76
1	7,58	7,54	7,57	7,53	8,17
2	8,18	8,27	8,44	8,44	8,18
24	7,53	7,76	7,92	7,90	7,88
48	7,49	7,64	7,88	7,83	7,83
72	8,15	7,94	7,96	7,96	8,20
96	7,71	7,43	7,68	7,58	7,84
120	7,79	7,79	7,99	8,07	8,17
144	7,51	7,49	7,53	7,57	7,51
168	7,52	7,64	7,57	7,54	7,57

Observação: o inóculo inicial foi de 166×10^9 (log = 11,22 UFC/ mL)

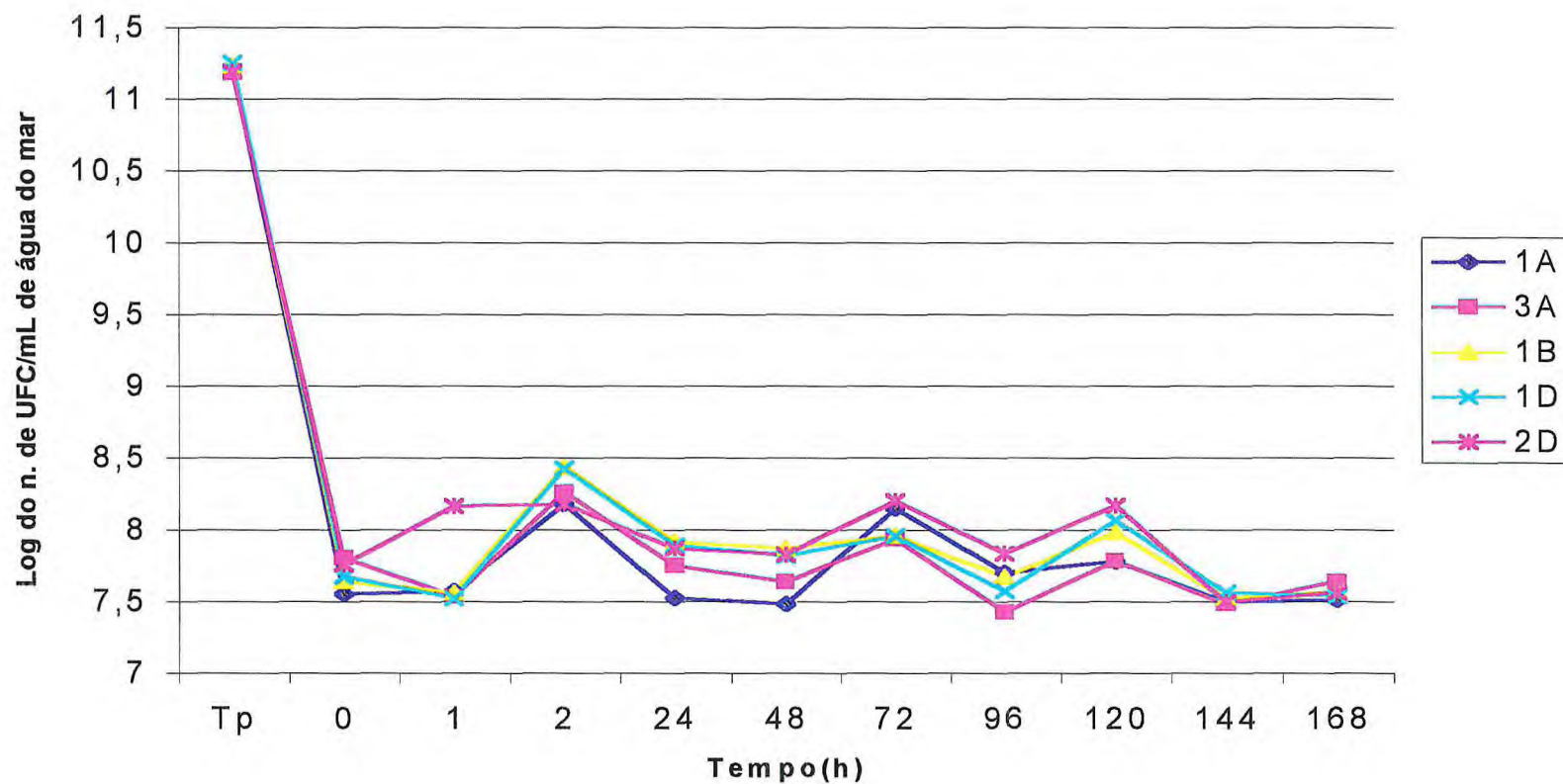


Figura 05 – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli*, obtido através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas na água do mar em temperatura de 37° C.

Obs. T_p é referente ao inóculo inicial de 10⁹

Semelhante ao experimento anterior, onde as incubações para contagem foram feitas na temperatura de 37°C, o segundo experimento, à temperatura de 44,5°C também ocorreu um grande decréscimo no número de células no momento da inoculação.

Na primeira hora do experimento a *Escherichia coli* apresentou um crescimento elevado, tornando a decrescer durante a segunda hora do experimento. Nos períodos de T₂₄ a T₄₈ o número de células cresceu, declinando novamente no período de T₇₂, sofrendo variação na quantidade de células nos períodos de T₉₆ a T₁₂₀ horas. No final dos experimentos (T₁₄₄ e T₁₆₈ horas), o número de bactérias permaneceu constante (Tabela II, Figura 06).

Tabela II – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli*, obtido através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas na água do mar em temperatura de 44,5° C.

Tempo (h)	Amostras				
	1A	3A	1B	1D	2D
0	7,58	7,84	7,62	7,63	7,76
1	8,31	8,33	8,31	8,32	8,33
2	7,48	7,79	7,49	7,54	7,49
24	7,56	8,08	7,57	7,57	8,24
48	8,03	8,41	8,03	8,06	8,35
72	7,81	8,08	7,81	7,77	7,81
96	7,54	7,59	7,56	7,51	7,56
120	7,90	7,83	7,89	7,89	7,80
144	7,54	7,51	7,54	7,53	7,52
168	7,48	7,49	7,51	7,56	7,56

Observação: o inóculo inicial foi de 166×10^9 (log = 11,22 UFC/mL)

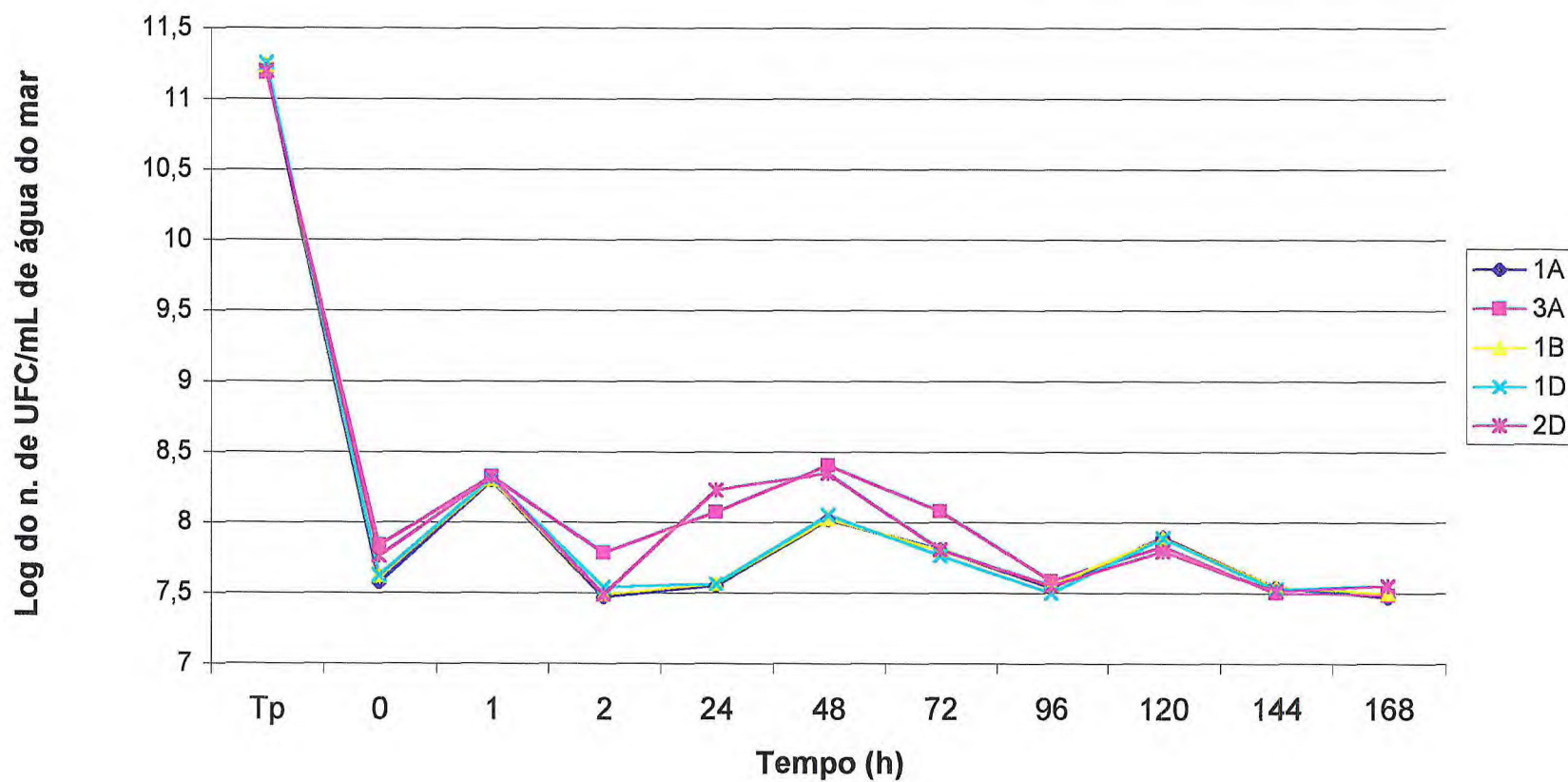


Figura 6 – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli*, obtido através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas na água do mar em temperatura de 44,5°.

Obs. T_p é referente ao inóculo inicial de 166×10^9 (log = 11,22 UFC / mL)

Um dos fatores limitantes ao crescimento da *Escherichia coli* é a temperatura, tanto elevada, acima de 44,5°C (HAGLER & HAGLER, 1988), como baixa, abaixo de 25°C (PELCZAR *et al.*, 1996), enquanto que para GAMESON & GOULD (1975), em observações anteriores, constataram que como fator limitante é mais importante a presença ou ausência de luz para o crescimento da *Escherichia coli*, do que variações de temperatura.

O que se observou em todo o experimento é que o sal pode não ser propriamente o único fator com efeito deletério sobre a célula, mas que um ou mais fatores físicos presentes no ambiente, e que não foram reproduzidos em laboratório, podem ter mais importância letal sobre a *Escherichia coli*. POMMEPUY *et al.* (1996), em estudos sobre a viabilidade de células de *Escherichia coli* expostas a água do mar e ao sol, concluíram que, quando as contagens eram feitas em placas que haviam sido incubadas no escuro, o número da bactéria não decrescia tanto, quanto quando elas eram incubadas e expostas a luz do sol.

Nossos experimentos foram feitos sob luz de laboratório, a qual não tem a penetração de um raio ultra violeta do ambiente, razão porque a redução do número de bactérias no final do experimento não foi da grandeza encontrada em literaturas afins (POMMEPUY *et al.*, 1996).

BARCINA *et al.* (1990) observaram menores decréscimos nos números de UFC de *Escherichia coli* inoculadas em água doce iluminada, do que essas mesmas culturas cultivadas em água marinha exposta a luz.

Halotolerância de *Escherichia coli* e redução da penetração da luz quando matéria particulada está presente tem sido mostrado, ser responsável pela continuidade da culturabilidade das células por dias, semanas ou mais tempo (POMMEPUY *et al.*, 1990; POMMEPUY *et al.*, 1992)

4 – CONCLUSÕES

– Às temperaturas de 37°C e 44,5°C, no T₀ houve uma redução no número de *Escherichia coli* de 31,6% e 31,4%, respectivamente, entre as amostras.

– No intervalo de T₀ a T₁₄₄ à temperatura de 37°C, a *Escherichia coli* obteve picos de crescimento, tendo sido o maior valor observado no T₂ com 8,30 ciclos logarítmicos.

– No intervalo de T₀ a T₁₄₄ à temperatura de 44,5°C, a *Escherichia coli* obteve picos de crescimento, tendo sido o maior valor observado no T₁ com 8,32 ciclos logarítmicos.

– A amostra 2D à temperatura de 37°C apresentou maior índice de variação em seus picos de crescimento (T₁, T₂, T₇₂ e T₁₂₀), seguido das amostras 1A (T₂ e T₇₂), 1D (T₂ e T₁₂₀) e 3A e 1B (T₂).

– A amostra 3A à temperatura de 44,5°C apresentou maior índice de variação em seus picos de crescimento (T₁, T₂₄, T₄₈ e T₇₂), seguido das amostras 2D (T₁, T₂₄ e T₄₈), 1A, 1B e 1D (T₁ e T₄₈).

– No tempo T₁₆₈ observou-se que a bactéria ainda resistia embora sem nenhum crescimento em ambas as temperaturas.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCINA, I.; GONZÁLEZ, J.M.; IRIBERRI, J. ; EGEA, L. – Survival Strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in Illuminated Fresh and Marine Systems. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 68, p. 189 –198, 1990.

BIER, O. – Bacteriologia Especial. Flora bacteriana normal e patológica do intestino. In: **Bacteriologia e Imunologia**. Rio de Janeiro:Ed. Melhoramento, pt.3, cap.23, p.425 – 432, 1970.

BRENNER, D.J. – Enterobacteriaceae. **BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins , p.409 – 423, 1984.

BYRD, J.J.; COLWELL, R.R. – Maintenance of Plasmids pBA 322 and pUC 8 Noncultivable *Escherichia coli* in the Marine Environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, p. 2104 – 2107, 1990.

CERQUEIRA, D.A.; MARTINS, T.K. – Estudo comparativo do sistema substrato definido com as técnicas de membrana filtrante e presença/ausência para recuperação de *Escherichica coli* exposta ao cloro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 17, Santos, SP,. Resumos... Santos, SP: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1993. p. 31, 1993.

CHAMBERLIN, C. E. ; MITCHELL, R. – A Decay Model for Enteric Bacteria in Nature Waters. In: R. Mitchell; *Water Pollution Microbiology*. New York, vol. 2, p. 325 – 368, 1978.

COLWELL, R.R.; BRAYTON, P.R.; GRIMES, D.J.; ROSZAK, D.R.; HUQ, S.A.; PALMER, I.M. – Viable, but Nonculturable *Vibrio cholerae* and Related Pathogens in the Environment: Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms. *Bio Technology*, v. 3, p. 817 – 820, 1985.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA - Resolução CONAMA n. 20, de 18 de junho de 1986. Resolução do CONAMA. 1984/86.2.ed. Brasília, DF: SEMA, p. 72 – 89,1986.

DUARTE, M.A.C.; LUCENA, J.H.; MAYER, M.G.R.; SOUSA, F.P. ; KONIG A. – Depuração das águas da microbacia de drenagem do campus II – UFPB – Campina Grande – PB. In: ENAMA, 5, Fortaleza, CE, 1996. Resumos... Fortaleza, CE, p. 55,1996.

FERNANDES, R. L.; KONING A., ; CEBALLOS, B.S.O. – O índice CF/EF: é válido para indicar a origem humana ou animal da contaminação fecal. In: ENAMA, 5, Fortaleza, CE, 1996. Resumos... Fortaleza, CE. p. 55, 1996.

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: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, Salvador, BA, 1999. Resumos... Salvador, BA: Sociedade Brasileira de Microbiologia, p. 22, 1999.

GAMESON, A.L.H. ; GOULD,D.J. – Effects of Solar Radiation on the Mortality of some Terrestrial Bacteria in Seawater. In *Discharge of Sewage From Sea Outfalls*, ed. Gameson, A.H.L.. Oxford: Pergamon, p.209-219, 1975.

GRIMES, D.J.; ATWELL, R.W.; BRAYTON, P.R.; ROLLINS, D.M.; ROSZAK, D.B.; SINGLETON, F.L.; TRAMPLIN, M.L. ; COLWELL, R.R. – The Fate of Enteric Pathogenic Bacteria in Estuarine and Marine Environments. *Microbiol. Sciences*, v. 3 , n. 11, p. 324 – 329, 1986.

HAGLER, A.N.; HAGLER, L.C.S.M. – Indicadores microbiológicos de qualidade sanitária. In: Roitman, I. Travassos, L.R. Azevedo, J.L. (eds.) **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Monole. v. 1, p. 85-102, 1988.

HAYES, P.R. – Toxiinfecções alimentarias y otras afecciones transmitidas por alimentos. In: *Microbiologia e higiene de los alimentos*. Tradução por Bernabé Sanz Perez. Zaragoza: Acribia, 1993. cap.2, item, 2.3.8: Otras toxiinfecções alimentarias bacterianas, p.50 - 52. Tradução de: *Food microbiology and hygiene*.

JAMES, P.N.; JAMES, B.K. – Diarrheagenic *Escherichia coli* *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 1, p. 142-201, jan. 1998.

MARTINS, M. T.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. – Utilização de bactérias e fungos como indicadores na avaliação de fatores fisiográficos que interferem nos processos de auto-depuração de um córrego sub-tropical. *Revista de Microb.*, São Paulo, v.20, n.3, p.278-291, Jul./Set. 1989.

MATES, A. – Effect of Seawater Storage on Coliforms, Faecal Coliforms and *Escherichia coli*. *Microbios*, v. 70, p. 43-48, 1992.

MEHLMAN, I.J.; ANDREWS, W.H.; WENTZ, B.A. – Coliform Bacteria. In: *Bacteriological Analytical*, 6th ed. Arlington, V.A.: Association of Official Analytical Chemistry, p. 5.01 – 5.07, 1984.



PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. – Cultivo e Crescimento de Microrganismos. In: **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. São Paulo: MAKRON Books – v. 1, cap. 6, p. 168, 1996.

PILONETTO, M.; PILONETTO, D. V. – Validação de uma metodologia para a análise microbiológica da água em 24 e 48 horas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, Salvador, BA, 1999. Resumos... Salvador, BA: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p. 24.

POMMEPUY, M.; GUILLAUD, J.F.; DUPRAY, E; DERRIEN,A.; L'YAVANE, J. AND CORMIER, M. – Le devenir des bactéries en zone littorale. La Mer et lês Rejets Urbains. IFREMER, Actes de Colloques, n. 11, p. 89 -100, 1990.

POMMEPUY, M.; GUILLAUD, J.F.;DUPRAY, E; DERRIEN,A.; LeGUYADEI,F. ; CORMIER, M. – Enteric bacteria survival factors. Water Sci. Techonol., n. 12, p. 93 -103, 1992.

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. Appl. Environ. Microbiol., v. 62, n. 12, p. 4621 – 4626, 1996.

TOMMASI, L. R. – A sentença de morte chamada lixo. **Super interessante especial**, São Paulo, n. 5, p.48, abril 1998.

SILVA, N. ; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.F.de A. – **Manual de Métodos de Análise Microbiológico de Alimentos**. São Paulo: Varela, p. 425, 1997.

SIQUEIRA, R. S. – **Manual de Microbiologia de Alimentos**. EMBRAPA – SPI. Rio de Janeiro, p. 73 –80, 1995.