

# **EFEITO DA RADIAÇÃO SOLAR NA SOBREVIVÊNCIA DE *Escherichia coli***

Effect of sunlight on the survival of *Escherichia coli*

Hilda Maria Pinheiro de Castro<sup>1</sup>, Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira<sup>1</sup>,  
Antonio Adauto Fonteles-Filho<sup>1</sup>, Waleska Ferreira de Albuquerque<sup>1</sup>, Ernesto Hofer<sup>2</sup>

## **RESUMO**

Um microcosmo experimental contendo água do mar com salinidade de 33 a 35‰ e pH entre 7,23 e 7,56 foi analisado, ressaltando o efeito da radiação solar associado à temperatura de exposição sobre uma amostra de *Escherichia coli* isolada de água de uma galeria pluvial, na praia do Mucuripe, Fortaleza-Ceará. Os sistemas contidos em frascos transparentes e de cor âmbar foram expostos à luz solar durante 10 dias consecutivos, tendo como controle um sistema incubado em ausência de luz (ambiente de laboratório). Verificou-se que *E. coli* apresentou viabilidade até 216 horas mesmo sob exposição à luz solar, embora nos dias de insolação tenha havido um decréscimo acentuado da população microbiana, a partir de 96 horas, principalmente quando em confronto com os resultados dos dias nublados e chuvosos, e com o controle. A temperatura se mantém mais elevada em dias ensolarados, de modo que a sobrevivência de *E. coli* aumenta em dias nublados e diminui em função do tempo de exposição à radiação solar, mas sem interação entre esses dois fatores causais. Verifica-se uma correlação inversa entre o número de células viáveis de *E. coli* e o tempo de exposição da cepa à radiação solar.

**Palavras-chaves:** *Escherichia coli*, sobrevivência, água do mar, radiação solar, temperatura.

## **ABSTRACT**

An experimental micro environment containing seawater with 33 to 35 salinity and 7.23 – 7.56 pH values was analyzed, where the temperature-related solar radiation was tested for its effect on a sample of *Escherichia coli* isolated from the water of a stormwater pipeline draining at Mucuripe beach, Fortaleza, Brazil. The systems contained in amber-color, transparent flasks were exposed to sunlight over a 10-day period, while an incubated system under absence of sunlight (laboratory medium) was held as control. *E. coli* was found to show viability up to 216 hours even under exposition to sunlight, although a sharp decrease was observed in the microbial population as from 96 hours, mainly when the data for sunny days were compared to those of cloudy days and to the control system. Temperature was always high in sunny days, so that survival of *E. coli* was shown to increase in cloudy days and to decrease as a function of exposition time, but without statistical interaction between those two factors. An inverse correlation was found to occur between number of viable cells of *E. coli*. and time of exposition of the strain to solar radiation.

**Key words:** *Escherichia coli*, survival, seawater, sunlight, temperature.

<sup>1</sup> Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av da Abolição 3207, Fortaleza, CE 60165-081.

<sup>2</sup> Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21045-900.

## INTRODUÇÃO

Vários são os parâmetros ou determinantes ecológicos envolvidos na sobrevivência de constituintes da flora microbiana alóctone ou transitória nos diversos ecossistemas aquáticos. As contaminações desses sistemas, inclusive os recreacionais, sofrem a notória influência humana, como consequência do desenvolvimento industrial, crescimento populacional, ocupação desenfreada do solo e deficiências no saneamento básico. Assim, as águas recreacionais, doces ou do mar, recebem microrganismos potencialmente patogênicos carregados pelos esgotos, água da chuva, atividades agropecuárias ou lançamento direto de fezes, vindo a se constituir em risco à saúde do homem e animais (Feachem *et al.*, 1983).

A detecção de enterobactérias indicadoras microbiológicas de poluição, assim como potencialmente patogênicas em água do mar (praias), tem sido uma observação constante em diferentes partes do mundo (WHO, 1998), com destaque para a cidade de Fortaleza, Ceará (Caland-Noronha & Morais, 1972; Vieira & Façanha, 1994; Melo *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 1999).

É importante salientar que a taxa de redução destas bactérias não decorre apenas da diluição mas também de outros fatores bióticos e abióticos. Dentre os vários estresses, a radiação solar exerce uma atividade importante na redução de coliformes no ambiente aquático (Alkan *et al.*, 1995; Pommepuy *et al.*, 1996; Gourmelon *et al.*, 1994 e 1997).

Tanto os raios ultra-violeta (UV) 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. O efeito da salinidade é, entretanto, mais significativo na presença da radiação ultra-violeta, tendo Davies & Evison (1991) concluído que a salinidade parece ser um importante fator na sobrevivência de bactérias expostas à luz solar.

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

## MATERIAL E MÉTODOS

O material de análise constou de uma amostra de 500 mL de água proveniente de uma galeria pluvial da Praia do Mucuripe (Fortaleza-Ceará), armazenada em frasco esterilizado de cor âmbar. Após o transporte imediato da amostra ao laboratório, procedeu-se à pesquisa de *Escherichia coli*, obtida através do isolamento e identificação segundo a orientação de Mehlman *et al.* (1984).

Paralelamente, foi coletada a água do mar da mesma praia, sendo medida a salinidade com o auxílio de um termômetro (Incoterm) e o pH determinado através de um medidor de pH, Micronal, B-347, e em seqüência o líquido foi autoclavado (121°/15min).

Para o estudo da sobrevivência da bactéria, foram criados microcosmos através da distribuição de alíquotas de 9 mL de água em 20 frascos, sendo 10 transparentes e 10 de cor âmbar. Em cada frasco foi inoculado 1 mL de uma suspensão da bactéria em solução salina com a turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, os frascos foram vedados com filme PVC para evitar a evaporação. Os recipientes transparentes foram mantidos em presença de luz solar em ambiente externo ao laboratório (nunca eram recolhidos, permanecendo durante todo o experimento sob a ação da luz solar) e os de cor âmbar (escuras para impedir a penetração da luz) em sala escura (vedada com papel nos vidros) à temperatura ambiente de laboratório.

Os experimentos foram dez vezes repetidos, visando analisar a variação temporal da sobrevivência nos intervalos entre 0 e 216 horas, considerando os diferentes valores de salinidade, pH (da água do interior dos frascos) e temperatura (externa e interna dos frascos).

A primeira contagem (todas foram feitas no mesmo horário, pela manhã) foi realizada logo após as inoculações nos frascos ( $T_0$ ), pelo plaqueamento em duplicata no meio PCA – Plate Count Agar (DIFCO), seguindo as orientações de Maturin & Peeler (2002). Os inóculos foram nomeados pela ordem:  $T_0$ ,  $T_2$ ,  $T_4$ ,  $T_6$ ,  $T_8$ ,  $T_{24}$ ,  $T_{48}$ ,  $T_{72}$ ,  $T_{96}$ ,  $T_{120}$ ,  $T_{144}$ ,  $T_{192}$  e  $T_{216}$ , representando os intervalos de tempo correspondentes.

Nas placas, após a incubação a 35°/24h, que apresentaram entre 25 e 250 colônias, foi calculado o logaritmo da Unidade Formadora de Colônias (UFC)/mL. Durante toda a experimentação a pureza das cepas de *E. coli* reisolada foi controlada por testes bioquímicos (Mehlman *et al.*, 1984).

Na análise estatística, foram utilizados o Teste t, Análise de Variância e Correlação, para se avaliar a variabilidade da temperatura em função da intensidade da radiação solar, e a influência indireta da radiação solar, através da temperatura em dias nublados e dias ensolarados sobre a sobrevivência de *E. coli* ao longo do período experimental, entre os intervalos de tempo 0 e 216 horas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os inóculos de *E. coli* no microcosmo de água do mar, expostos à luz solar, mostraram um declínio na sua sobrevivência. Observa-se que nas repetições

do experimento durante os dias ensolarados, quando a luminosidade era maior, a queda na sobrevivência das cepas foi muito mais drástica do que nos dias nublados ou chuvosos (Tabela I).

Tabela I – Média das contagens de *Escherichia coli* inoculada em água do mar e estocada na presença de luz solar e em ambiente de laboratório, em logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

Tempo de exposição (h)	Média log (UFC/mL)	
	luz solar	laboratório
0	8,93	8,93
2	8,87	8,97
4	8,12	8,98
6	7,79	8,92
8	8,10	8,95
24	7,59	9,03
48	6,68	8,87
72	6,21	8,79
96	5,93	8,71
120	6,27	8,76
144	5,50	8,68
168	5,01	8,65
192	4,73	8,53
216	4,46	8,66

O fato da cepa de *E. coli* ter sido isolada na saída de uma galeria pluvial exposta ao fluxo das marés pode ter influenciado na sua sobrevivência e, de alguma forma, proporcionado uma adaptação prévia das cepas às condições osmóticas do meio marinho. Segundo Munro *et al.* (1987 e 1989) e Gauthier *et al.* (1987), células pré-adaptadas a altas osmolaridades são resistentes à água do mar.

Da mesma maneira, Gauthier (1992) mostrou que a capacidade de sobrevivência das enterobactérias 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.

A cepa inoculada nas mesmas condições daquela exposta à luz solar, mas incubada em ausência de luz (experimento-controle), mostrou uma constância na sua viabilidade, sobrevivendo sem apresentar decréscimo significativo no decorrer do experimento (Tabela I). Segundo Gourmelon *et al.* (1997), a sobrevivência de *E. coli* em água marinha, no escuro, é bem maior do que em condições de iluminação a partir da observação de que células inoculadas em água do mar e incubadas em ausência de luz permaneciam viáveis e cultiváveis 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 verificaram que a redução do número de bactérias ao final de 168 horas não foi da grandeza encontrada por Pommeypuy *et al.* (1996). Provavelmente tal discrepância decorreu do fato de a intensidade dos raios ultravioleta em ambiente de laboratório ser 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 despejos de esgotos em águas marinhas. As pesquisas se concentraram, principalmente, na influência desse parâmetro sobre a redução de *E. coli* e enterococos, importantes indicadores de poluição fecal nesses ambientes (Alkan *et al.*, 1995).

As médias da temperatura dentro dos microcosmos contaminados e expostos à luz solar, medidos no início do experimento, ficaram entre 28,75 e 38,50° C (Tabela II; Figura 1). Na ausência de luz, as médias da temperatura nas 10 repetições do experimento (um a um) variaram de 28,35 a 29,0° C (Tabela II; Figura 2). Portanto, pode-se observar que a temperatura variou bastante nos dias ensolarados, talvez sendo responsável pela tendência decrescente do valor de UFC/mL, o contrário ocorrendo em dias nublados, em que tanto a temperatura quanto o valor de UFC/mL pouco variaram, fatos também observados por Alkan *et al.* (1995).

Tabela II – Variação da temperatura em experimentos realizados sobre a sobrevivência de *Escherichia coli*, na presença de luz solar e em ambiente de laboratório.

Tempo de exposição (h)	Temperatura média (°C)	
	luz solar	laboratório
0	28,75	28,75
2	36,25	28,45
4	38,50	28,65
6	38,10	28,45
8	33,25	28,50
24	35,20	28,45
48	33,95	28,55
72	34,85	28,25
96	34,60	28,55
120	34,60	28,35
144	35,70	28,70
168	33,70	28,70
192	35,40	29,00
216	35,80	28,80

As taxas de mortalidade são independentes da variação de temperatura na faixa 10 - 30°C. Gauthier *et al.* (1993) afirmam que o risco de poluição de águas marinhas por *E. coli* e por extensão, pelas enterobac-

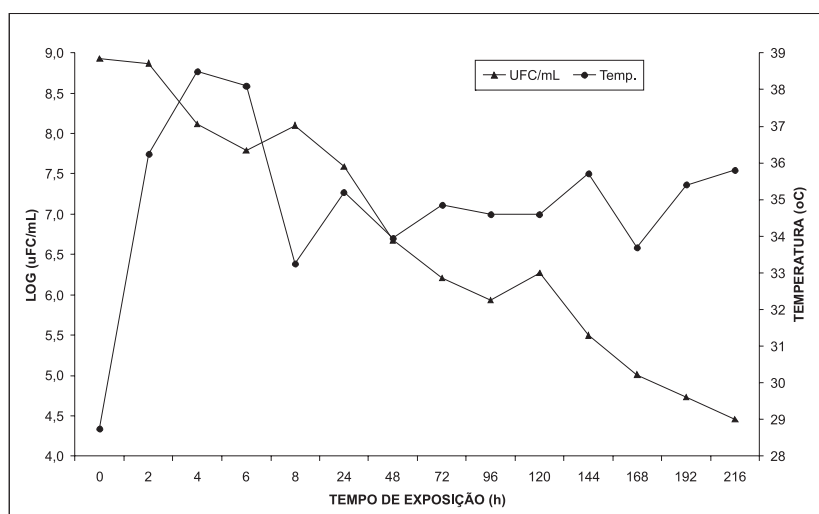


Figura 1 – Variação da média do Log UFC/mL nos experimentos em presença de luz versus a média da temperatura por horas de incubação.

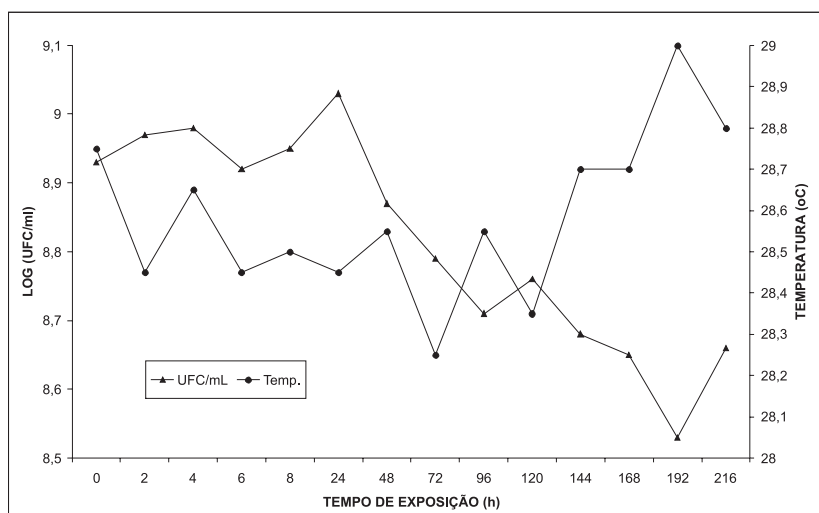


Figura 2 – Variação da média do Log UFC/mL nos experimentos em ausência de luz versus a média da temperatura por horas de incubação.

térias patogênicas para o homem, é muito mais acentuado em águas quentes e ricas em matéria orgânica.

A salinidade e o pH no decorrer do experimento variaram de 33 a 35‰ e 7,23 a 7,56, respectivamente. Munro *et al.* (1987) demonstraram que a adaptação de bactérias em meio salino proporcionava um aumento da sua sobrevivência em água do mar. Davies & Evison (1991), analisando a viabilidade de *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium expostas à água do mar, observaram uma associação estatisticamente significativa entre a redução bacteriana e a salinidade. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o efeito letal da luz é otimizado pela alta salinidade da água.

De acordo com Carlucci & Pramer (1960 in 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. Enquanto um pH ácido, em torno de 5,0, favorece a sobrevivência da *E. coli*, o pH da água do mar, em torno de 8,0, tem um efeito mais deletério sobre a bactéria.

Até a década de 70, a sobrevivência das bactérias entéricas no ambiente marinho era considerada como de curta duração pois, aparentemente, eram destruídas rapidamente pelos chamados fatores antagonistas (temperatura, radiação solar, salinidade, pH) (Gauthier, 1992).

A descoberta de que as bactérias entéricas podem adaptar-se às condições hostis do ambiente através de um "estado de dormência" (viáveis, mas não cultiváveis -VBNC), mantendo a virulência, modificou os conceitos de mortalidade e recolocou em no-

vos termos o problema dos riscos sanitários veiculados pelos despejos de esgotos (Xu *et al.*, 1982; Gauthier *et al.*, 1992; Pommepuy *et al.*, 1996).

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

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 10, 15, 25 e 30‰ evidenciou que o decréscimo da salinidade era acompanhado por um aumento da viabilidade e que a limitação de nutrientes, produto secundário do estresse osmótico, era naquele momento um fator mais dominante que a salinidade.

A partir da análise estatística, foram obtidos os seguintes resultados: (a) não existe correlação entre o período de exposição à radiação solar e a temperatura, em dias nublados ( $r = -0,0073$ ;  $P > 0,05$ ) ou dias ensolarados ( $r = 0,0908$ ;  $P > 0,05$ ); (b) em dias ensolarados a temperatura é mais elevada que em dias nublados ( $t = 4,119$ ;  $P < 0,05$ ); (c) a sobrevivência de *E. coli* é maior em dias nublados ( $F = 77,23$ ;  $P < 0,05$ ), sendo que esta se reduz com o tempo de exposição à radiação solar ( $F = 17,89$ ;  $P < 0,05$ ); (d) não existe interação entre a temperatura e tempo de exposição ( $F = 1,84$ ;  $P > 0,05$ ), significando que, independente do período de incubação, a sobrevivência varia significativamente quando a temperatura é mais elevada. Estas correlações foram anteriormente bem demonstradas nos trabalhos de Barcina *et al.* (1990), Davies & Evison (1991), Pommepuy *et al.* (1996) e Gourmelon *et al.* (1994 e 1997).

Muitos estudos têm sido efetuados com base na perda da capacidade de crescimento *in vitro* e baixos valores de contagens têm sido obtidos 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 viabilidade por, no mínimo, três anos, adaptando-se seletivamente à salinidade, além de também reter plasmídios sob esta condição. Esse fato tem implicações na liberação, no meio marinho, de microrganismos geneticamente modificados (Lebaron *et al.*, 1994).

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a resistência apresentada pela bactéria *E. coli* à água do mar observada nos dias nublados ou chuvosos é um fator importante, uma vez que sua sobrevivência nessas condições é muito maior do que nos dias ensolarados, o que acentua o risco de transmissão de doenças entéricas aos usuários das praias. Considerando a baixa resistência de *E.coli* na água do mar sob forte influência de raios solares, era de se esperar baixas

concentrações desse microrganismo nas águas costeiras nordestinas, o que não ocorre porque as praias recebem constantemente um grande aporte de material fecal (Vieira *et al.*, 2002).

Dupray & Derrien (1995) demonstraram que a sobrevivência de bactérias em água do mar é menor quando estas transitam em águas usadas antes de serem lançadas no ambiente marinho, o que ressalta a importância do período de adaptação e menor estresse no processo de sobrevivência desses microrganismos.

## 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*, v.29, p.2071-2081, 1995.
- Barcina, I.; Gonzales, J.M.; Iriberry, J. & Egea, L. Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. *J. Appl. Bacteriol.*, v.68, p.189-198, 1990.
- Byrd, J.J. & Colwell R.R. Long-term survival and plasmid maintenance of *Escherichia coli* in marine microcosm. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v.12, p. 9-14, 1993.
- Caland-Noronha, M.C. & Morais, J.O. Aspectos da poluição marinha em frente ao município de Fortaleza. *Arq. Ciên. Mar*, v.12, p.109-115, 1972.
- Davies, C.M. & Evison, L.M. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.*, v.70, p.265-274, 1991.
- 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*, v.29, p.1005-1011, 1995.
- Feachem, R.G.; Bradley, D.J.; Garelick, H. & Duncan Mara, D. Pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* and other bacterial indicator of fecal pollution, p. 199-242, in *Sanitation and disease health aspects of excreta and wastewater management*. John Wiley & Sons, New York, 1983.
- Gauthier, M.J.; Munro, P.M. & Mohajer, S. Influence of salts and sodium chloride on the recovery of *Escherichia coli* from seawater. *Current Microbiol.*, 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. *J. Appl. Bacteriol.*, 73:257-262, 1992.
- Gauthier, M.J. Influence des systèmes d'osmoregulation sur la survie et l'adaptation des bactéries entériques dans l'environnement marin, in *PNUE/OMS – Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Survie des pathogènes*. MAP Technical Reports Series, n.63, 1992.

- Gauthier, M.J.; Breittmayer, V.A. & Braux, A.S. Expression génique chez les bactéries entériques dans les conditions marines in *PNUE/OMS – Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (activité K): survie des pathogènes*. MAP Technical Reports Series, n. 76, 1993.
- Gourmelon, M.; Cillard, J. & Pommepuy, M. Visible light damage in *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *J. Appl. Bacteriol.*, 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. *Can. J. Microbiol.*, v.43, p.1036-1043, 1997.
- Lebaron, P.H.; Batailler, N.; & Baleux, B. Mobilization of a recombinant nonconjugative plasmid at the interface between wastewater and the marine coastal environment. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v.15, p.61-70, 1994.
- 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. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~bam/bam-3.html>. acesso em 25/11/2002.
- Mehlman, I.J.; Andrews, W.H. & Wentz, B.A. Coliform bacteria, in *Bacteriological Analytical Manual*. Association of Official Analytical Chemists, 6<sup>th</sup> edition, p. 5.01 – 5.07, Arlington, 1984.
- 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*, v.13, p.463-470, 1997.
- Munro, P.M.; Laumond, F.M. & Gauthier, M.J. A previous growth of enteric bacteria on a salted medium increases their survival in seawater. *Let. Appl. Microbiol.*, 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.55, p. 2017-2024, 1989.
- 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.42, p.4621-4626, 1996.
- Rozen, Y. & Belkin, S. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.725, p.1-17, 2001.
- Vieira, R.H.S.F. & Façanha, S.H.F. Parâmetros físico-químicos e pesquisa de coliformes totais, fecais e *Vibrio parahaemolyticus* na águas do Rio Cocó. *Ciê. Agron.*, v.25, p. 24-31, 1994.
- Vieira, R.H.S.F.; Silva, P.F.G.; Lehugeur, L.G.O. & Sousa, O.V. Colimetria da água da praia da Barra do Ceará – Fortaleza – Ceará. *Arq. Ciên. Mar*, 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.; Saker-Sampaio, S. & Lima, E.A. Análise experimental sobre a viabilidade de *Escherichia coli* em água do mar. *Arq. Ciên. Mar*, v.34, p.43-48, 2001.
- Vieira, R.H.S.F.; Rocha, C.A.S.; Menezes, F.G.R.; Aragão, J.S.; Rodrigues, D.P.; Theophilo, G.N.D. & Reis, E.M.F. Poluição da água do mar e da areia de três praias de Fortaleza, Ceará, Brasil. *Arq. Ciên. Mar*, v.35, p.113-118, 2002.
- WHO. *Guidelines for safe recreational water environments: coastal and fresh-waters*. Vol. 1. World Health Organization, 206 p., Geneva, 1998.
- 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. *Microb. Ecol.*, v.8, p.313-323, 1982.