

GRAZIELE CRISTINA STRADIOTTO

Densidade e resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli* isoladas de águas , areias e algas do gênero *Sargassum* de praias recreacionais do Litoral Norte do Estado de São Paulo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira

Rio Claro

2013

576

S895d Stradiotto, Grazielle Cristina

Densidade e resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli* isoladas de águas , areias e algas do gênero *Sargassum* de praias recreacionais do Litoral Norte do Estado de São Paulo / Grazielle Cristina Stradiotto. - Rio Claro, 2013
96 f.: il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Ana Julia Fernandes Cardodso de Oliveira

1. Microrganismos. 2. Contaminação em praias recreacionais. 3. Antibióticos. 4. Oceanos. 5. Bactérias. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

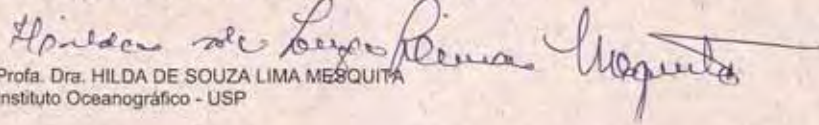
TÍTULO: DENSIDADE E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Enterococcus* sp e *Escherichia coli* ISOLADOS DE ÁGUAS, AREIAS E ALGAS DO GÊNERO *Sargassum* DE PRAIAS RECREACIONAIS DO LITORAL NORTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

AUTORA: GRAZIELE CRISTINA STRADIOTTO

ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA JULIA FERNANDES CARDOSO DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ANA JULIA FERNANDES CARDOSO DE OLIVEIRA
Coordenadora Executiva / Unidade do Litoral Paulista / UNESP


Profa. Dra. HILDA DE SOUZA LIMA MESQUITA
Instituto Oceanográfico - USP


Profa. Dra. SELMA DZIMIDAS RODRIGUES
Coordenadora Executiva / Unidade do Litoral Paulista / UNESP

Data da realização: 09 de maio de 2013.

Dedico este trabalho a minha mãe que não mediu forças para me ajudar a conquistar tudo o que agora sou, sei que está orgulhosa de mim e que ao lado Deus agora guia os meus passos e me da à luz necessária para que mesmo quando cair eu saiba me levantar e lutar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado durante esta caminhada, por ter me dado forças para seguir em frente diante de tantos obstáculos que tive que se não fosse por tua luz em minha vida nada teria conquistado.

Aos meus pais João e Maria Rita (*in memoriam*) por todo apoio que me deram durante estes anos, nos momentos felizes e tristes estiveram comigo e sempre me incentivaram para que eu lutasse a cada dia para alcançar meus objetivos. É por vocês que lutaram pela minha vitória que estou aqui, é para vocês que dedico tudo o que fiz até hoje e ainda farei. Os amo mais do que tudo!!

Às minhas irmãs queridas que amo, Daiane e Mirele, que me apoiaram e estiveram ao meu lado, e que perto ou longe me deram forças para que eu não desistisse diante do momento mais triste de nossas vidas. Estaremos sempre unidas para que lá de cima a mãe veja nossos êxitos.

À minha orientadora, a Prof.^a Dra. Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira, muito obrigada por ter me aceitado no projeto, por sua orientação, pelos conhecimentos adquiridos no laboratório, pelos conselhos, pelos momentos de descontração, pela amizade e pela aprendizagem para se desenvolver um trabalho científico durante meu mestrado.

Às meninas do laboratório de Microbiologia Marinha da UNESP de São Vicente, Thais, Cris, Rapha, Bruna, Luana, Mirela, Érika, Van, obrigada pela ajuda no laboratório, nas coletas, pelas fofocas e risadas no Micromar, sem vocês eu não teria conseguido realizar este trabalho, obrigada de coração a todas.

Ao Wagner Vilano que juntamente com a Prof.^a Ana Julia e a Prof.^a Célia me incluíram no projeto dos Costões Rochosos, obrigada pelo apoio nas coletas e pela ajuda com os dados do trabalho.

A todos meus queridos amigos de Rio Claro, especialmente Juliana, Ana Carolina (Simpatia), Vinicius e Pedro, obrigada por estarem sempre ao meu lado, por nossas risadas de madrugada, mesmo que pela internet, vocês sempre me divertem! Adoro vocês!!

Aos professores do programa de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada da UNESP de Rio Claro.

A Capes e a FAPESP pelo apoio financeiro ao meu trabalho de Mestrado e ao projeto todo dos Costões Rochosos de Ubatuba.

Muito Obrigada!!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.
(Isaac Newton)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a densidade e a resistência de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli*, em águas e areias e *Sargassum* sp em três praias do município de Ubatuba-SP, bem como avaliar a relação da densidades com fatores abióticos, tais como temperatura, salinidade e precipitação. As amostras foram coletadas nas praias de Perequê Mirim e Enseada em dois pontos e em um único na praia da Fortaleza, a qual não é monitorada pela CETESB. Utilizou-se a técnica da membrana filtrante na filtração das amostras. Os resultados obtidos mostraram altas densidades de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp em areias e *Sargassum* sp, isto mostra que é necessário que sejam implantados programas de monitoramento para as areias das praias, já que estas estão mais contaminadas que as águas. As algas, que são utilizadas em diversos fins, estão altamente contaminadas indicando a poluição do ambiente. Nas águas o valor só ultrapassou o limite estabelecido na legislação na praia do Perequê Mirim para as densidades de *E.coli* em junho e outubro. Contudo ao se comparar com os resultados obtidos pela CETESB, verificou-se que a água da praia Perequê Mirim permaneceu imprópria de dezembro/2011 a agosto/2012 e que na praia da Enseada a água esteve imprópria nos meses de janeiro, fevereiro e junho de 2012. Houve correlação negativa das densidades com a salinidade, com a temperatura e a precipitação. A resistência antimicrobiana para as cepas isoladas da água, areias e *Sargassum* apresentaram em quase 100% destas, resistência a quase todos os antibióticos utilizados, o que sugere múltipla resistência para estas cepas. A estação de verão-outono foi a que apresentou maiores taxas de resistência para as cepas de *Enterococcus* sp, já para e *Escherichia coli* as taxas foram altas em todas as estações.

Palavras chave: 1-Microrganismos. 2-Contaminação em praias recreacionais. 3-Antibióticos. 4-Oceanos. 5-Bactérias

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the density and resistance of *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp in sand and water and *Sargassum* sp in three beaches of Ubatuba-SP and evaluate the relationship of density and abiotic factors such as temperature, salinity and precipitation. The samples were collected at two points Perequê Mirim's beach and Enseada's beach and at one point Fortaleza' beach, which is not monitored by CETESB. We used the membrane filter technique in filtering the samples. The results showed high densities of *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp sands and *Sargassum* sp, it must be implemented monitoring programs for the sandy beaches, as these are more contaminated than water. These algae are used in various purposes are highly contaminated indicating environmental pollution. In the waters only the value exceeded the limit established by legislation at Perequê Mirim's beach for *E. coli* densities in June and October. However when compared with the results obtained by CETESB, it was found that the water at Perequê Mirim's beach remained improper December of 2011 the august of 2012 and at Enseada's beach water was improper for the months of January, February and June 2012. There was a negative correlation with salinity, with temperature and precipitation. Antimicrobial resistance for strains isolated from water, sand and *Sargassum* showed almost 100% of these, resistance to almost all antibiotics, suggesting multiple resistance to these strains. The season of summer-autumn showed the highest rates of resistance to the strains of *Enterococcus* sp, and *Escherichia coli* to have rates were high in all seasons.

Keywords: 1-Microorganisms. 2-Contamination in recreational beaches. 3-Antibiotics. 4-Oceans. 5-Bacteria

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Costões Rochosos e <i>Sargassum</i>.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Área de estudo.....	18
3.2. Coleta e processamento das amostras.....	19
3.3. Determinação da densidade de <i>Enterococcus</i> sp.....	20
3.4. Determinação da Densidade de <i>Escherichia coli</i>.....	22
3.5. Meios de cultura.....	24
3.6. Salinidade, temperatura, precipitação.....	25
3.7. Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	26
3.8. Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Densidade de <i>Escherichia coli</i> em água.....	30
4.2. Densidade de <i>Escherichia coli</i> em areias.....	31
4.3. Densidade de <i>Escherichia coli</i> em <i>Sargassum</i>.....	33
4.4. Densidade de <i>Enterococcus</i> sp em água.....	35
4.5. Densidade de <i>Enterococcus</i> sp em areias.....	36
4.6. Densidade de <i>Enterococcus</i> sp em <i>Sargassum</i>.....	38
4.7. Relação entre a Densidade de <i>Escherichia coli</i> e fatores abióticos.....	39
4.8. Relação entre a Densidade de <i>Enterococcus</i> sp e fatores abióticos.....	47
4.9. Resistência a antimicrobianos de <i>Escherichia coli</i>.....	54
4.10. Resistência a antimicrobianos de <i>Enterococcus</i> sp.....	69
4.11. Análise estatística.....	82
5. DISCUSSÃO.....	85
6. CONCLUSÃO.....	90
7. REFERÊNCIAS.....	91

1. Introdução

Os oceanos oferecem muitos benefícios ao homem, como a obtenção de alimentos, novas drogas para o tratamento de doenças e atividades de recreação, e com isto uma grande parte da população mundial vive em regiões costeiras. O aumento populacional acarreta uma produção elevada de lixo e esgoto sendo que este crescimento nem sempre é acompanhado em melhorias na infraestrutura do saneamento básico. Este fato leva a uma grande preocupação em relação à qualidade tanto das águas recreacionais quanto das praias em si (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Com o crescente desenvolvimento do turismo em ambientes litorâneos, decorrente de atividades recreacionais, tais como natação, mergulho, esportes náuticos e pesca, diversos impactos ambientais têm sido gerados, sendo que apenas recentemente tem se lhes dado a devida atenção (CETESB, 2006).

O principal impacto antropogênico ocasionado pelo aumento populacional em cidades litorâneas é o despejo de esgotos domésticos “in natura” diretamente no mar, levando uma variedade micro-organismos patogênicos como bactérias, vírus e protozoários. A presença desses micro-organismos pode ocasionar doenças de veiculação hídrica aos banhistas, como gastroenterites, hepatite A, cólera, febre tifóide e até outras não relacionadas ao trato gastrointestinal, como dermatoses, conjuntivite, otite e as da região da nasofaringe (WHO, 1998).

A qualidade da água para fins de recreação de contato direto e prolongado com a água (contato primário) é denominada balneabilidade. No Estado de São Paulo a balneabilidade das praias é monitorada pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) e seu programa esta estruturado para atender a Resolução CONAMA n°274/2000, Segundo os critérios estabelecidos, as praias são classificadas em relação à balneabilidade, em duas categorias: Própria e Imprópria sendo que a primeira reúne três categorias distintas: Excelente, Muito Boa e Satisfatória. Essa classificação é feita de acordo com as densidades de bactérias fecais resultantes de análises feitas em cinco semanas consecutivas. A Legislação prevê o uso de três indicadores microbiológicos de poluição fecal: coliformes termotolerantes (antigamente denominados Coliformes fecais), *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp (Figura 1).

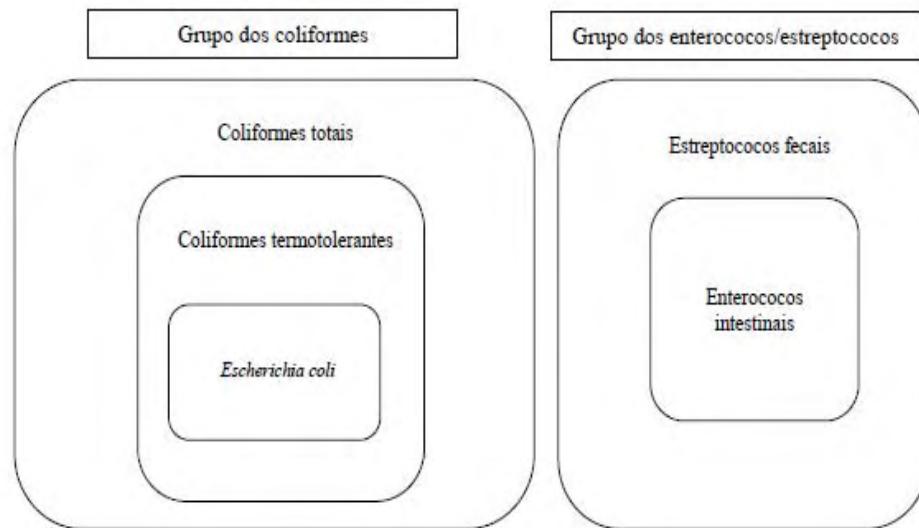


Fig.1. Grupo de microrganismos indicadores de poluição fecal (CETESB, 2010)

Os critérios adotados pela CETESB encontram-se na tabela 1, a saber: para águas marinhas é o seguinte: densidades de Enterococos superiores a 100 UFC/100 mL, em duas ou mais amostras de um conjunto de cinco semanas, ou valores superiores a 400 UFC/100 mL na última amostragem, caracterizam a impropriedade da praia para recreação de contato primário. Sua classificação, como Imprópria, indica um comprometimento na qualidade sanitária das águas, implicando em um aumento no risco de contaminação do banhista e tornando desaconselhável a sua utilização para o banho (CETESB, 2010).

Tabela 1: Limites de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp por 100 mL de água, para cada categoria (CETESB,2010)

CATEGORIA		Coliforme Termotolerante (UFC/100 mL(*)	Escherichia coli (UFC/100 mL)	Enterococos (UFC/100 mL)
PRÓPRIA	EXCELENTE	Máximo de 250 em 80% ou mais tempo	Máximo de 200 em 80% ou mais tempo	Máximo de 25 em 80% ou mais tempo
	MUITO BOA	Máximo de 500 em 80% ou mais tempo	Máximo de 400 em 80% ou mais tempo	Máximo de 50 em 80% ou mais tempo
	SATISFATÓRIA	Máximo de 1.000 em 80% ou mais tempo	Máximo de 800 em 80% ou mais tempo	Máximo de 100 em 80% ou mais tempo
IMPRÓPRIA		Superior a 1.000 em mais de 20% do tempo	Superior a 800 em mais de 20% do tempo	Superior a 100 em mais de 20% do tempo
		Maior que 2.500 na última medição	Maior que 2.000 na última medição	Maior que 400 na última medição

(*) UFC (Unidade formadora de colônia) contagem de unidades formadoras de colônia em placas obtidas pela técnica de membrana filtrante.

A divulgação das condições de balneabilidade das praias é feita através da emissão de boletins informativos obtidos com base nas últimas cinco semanas de amostragem dos resultados de densidades de bactérias fecais. Além da divulgação dos resultados para a imprensa, prefeituras e outros órgãos, a divulgação também é realizada nas próprias praias, por meio de bandeiras. Essas bandeiras são colocadas em mastros fixados na areia, exatamente em frente ao local onde é colhida a amostra de água do mar. A bandeira de cor verde indica que a qualidade da água está adequada para o banho, sendo a praia classificada como Própria. A bandeira de cor vermelha é utilizada para praias Impróprias, indicando que o banho de mar deve ser evitado. A sinalização é mantida ou substituída no dia seguinte à emissão do boletim, de acordo com a nova classificação estabelecida para a praia. A partir de 2008, em nove praias a sinalização por bandeiras foi substituída por totens luminosos que sinalizam em vermelho as praias Impróprias e em verde as praias Próprias (CETESB, 2010) (Figura 2).



Fig.2. Os tipos de bandeiras e totem utilizados na sinalização das praias (CETESB, 2010)

No município de Ubatuba, são monitorados 26 pontos em 23 praias e um ponto no Rio Itamambuca. As praias Itaguá e Lagoinha têm 2 pontos de amostragem. Em 2010, 57% das praias permaneceram Próprias durante todo o ano, apresentando uma pequena piora em relação ao ano de 2009, quando 62% das praias permaneceram Próprias o ano todo. Nos últimos 10 anos, as praias do município ficaram, em média, 91% do tempo na condição Própria (Gráfico 1b). Os 15 pontos que permaneceram Próprios o ano todo receberam qualificação anual Boa e Ótima (Gráfico 1a). Apenas as praias Prumirim e Itamambuca receberam a qualificação anual Ótima. As praias que receberam qualificação anual Péssima foram Itaguá, no ponto 1 e Perequê Mirim. (CETESB, 2010).

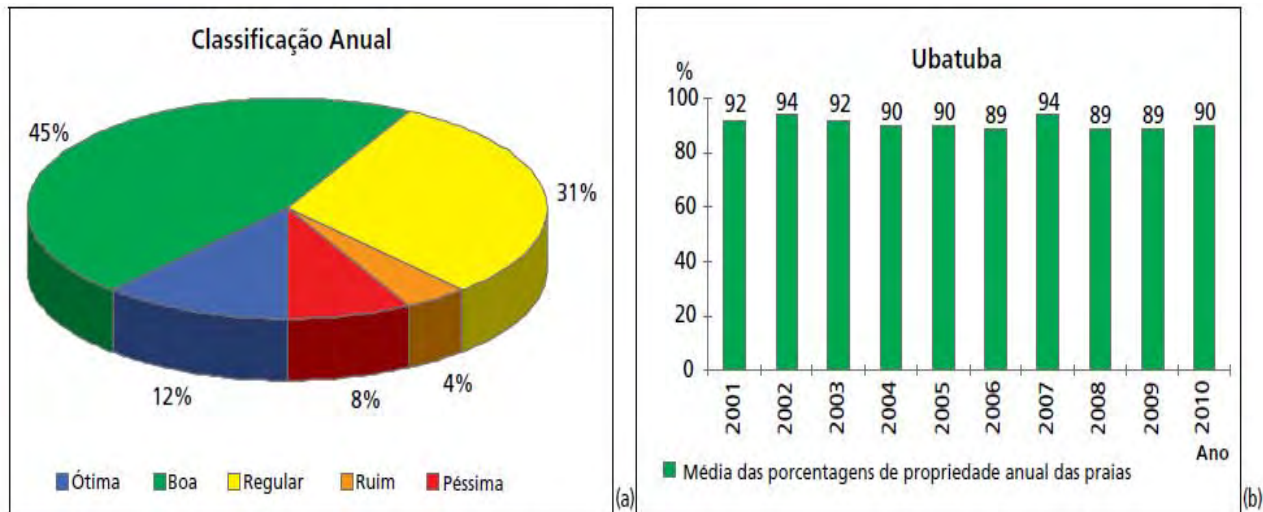


Gráfico 1 – Classificação anual (a) e média das porcentagens de propriedade anual das praias (b). Fonte: CETESB (2010)

Embora os programas de monitoramento das águas recreacionais marinhas já tenham sido implantados em vários estados brasileiros com escasso sucesso, pouca atenção tem sido dada as areias das praias as quais estão sendo desconsideradas do ponto de vista da saúde pública. Devido à potencialidade de conter altas densidades de patógenos, o contato prolongado com as areias de praias contaminadas talvez apresente mais risco à saúde das pessoas do que o contato com a própria água (GHINSBERG *et al.*, 1994; PAPADAKIS *et al.*, 1997).

Vários estudos têm mostrado que as areias das praias podem conter maiores concentrações bacterianas do que a coluna d'água (GHINSBERG *et al.*, 1994; OSHIRO & FUJIOKA, 1995) uma vez que as bactérias podem sobreviver neste ambiente por muito tempo (WHITMAN & NEVERS, 2003) por encontrarem condições favoráveis de nutrientes (BRUNKE & FISCHER, 1999; DAVIES *et al.*, 1995; VILLAR *et al.*, 1999), proteção contra a luz solar (DAVIES-COLLEY *et al.*, 1999) e contra a predação por protozoários (DAVIES & BAVOR, 2000).

A movimentação de barcos ou veículos nas praias e a ressuspensão de areias e/ou sedimentos por intempéries contribuem significativamente para que as bactérias contidas na areia sejam liberadas para a coluna de água, aumentando o número de bactérias na água (AN *et al.*, 2002; CRABILL *et al.*, 1999; LALIBERTE & GRIMES, 1982; OBIRI-DANSO *et al.*, 1999; STEPHENSON & RYCHERT, 1982). A detecção e a quantificação de indicadores em areias recreacionais são de grande importância para verificar o risco da presença de

microrganismos patogênicos neste ambiente (CABELLI *et al.*, 1982), as fontes de contaminação presentes e a influência que as altas densidades bacterianas verificadas na areia podem ter na qualidade da água adjacente.

Algumas pesquisas realizadas com o objetivo de contribuir para o estudo da contaminação de areias de praia utilizaram como microrganismos indicadores a bactéria *Escherichia coli* e a levedura *Candida albicans* (MENDES *et al.*, 1993), entretanto, estudos mais recentes indicam que as bactérias do gênero *Enterococcus* parecem se acumular mais na areia do que as da espécie *Escherichia coli* (ALM *et al.*, 2003), sendo assim seriam melhores indicadoras também para este tipo de ambiente.

As águas recreacionais marinhas que recebem esgotos domésticos, bem como as areias, podem contribuir para o estabelecimento de rotas de disseminação de microrganismos carreadores de genes de resistência a antimicrobianos (MEIRELLES-PEREIRA *et al.*, 2002).

O uso massivo de antibióticos leva a resistência bacteriana que é um problema crescente no mundo todo, gerado por processos de seleção (FRIEDEN *et al.*, 1993). O despejo de efluentes provenientes de ambientes fortemente seletivos para cepas resistentes tais como hospitais, indústrias, atividades veterinárias, aquicultura, entre outros, tem levado a um aumento da distribuição e da frequência de genes bacterianos de resistência, inclusive em ambientes aquáticos (SCHWARTZ *et al.*, 2003).

Um dos gêneros mais importantes em relação à resistência a antimicrobianos é o *Enterococcus* (HUYCKE *et al.*, 1998), que até pouco tempo era considerado um Estreptococo fecal. Os enterococos se diferenciam dos estreptococos porque podem crescer em pH 9,6, em meio de cultura com 6,5% de NaCl, a temperaturas de 10°C a 45°C e sobreviver por até 30 minutos a 60°C (HARWOOD *et al.*, 2000; HANCOCK & GILMORE, 2006).

Recentemente, infecções por *Enterococcus* sp tornaram-se um grande desafio terapêutico devido ao aumento da incidência e da variabilidade de cepas resistentes (ARVANITIDOU *et al.*, 2001), sendo os fenótipos de resistência mais importantes àqueles relacionados aos aminoglicosídeos (estreptomina e gentamicina), betalactâmicos (amoxicilina e ampicilina) e glicopeptídeos (teicoplanina e vancomicina) (D'AZEVEDO *et al.*, 2004).

Estas bactérias, além de apresentarem resistência intrínseca a muitos antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e clindamicina, podem também, através da conjugação, adquirir genes de resistência presentes em plasmídeos (HUYCKE *et al.*, 1998) e disseminá-los a bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes (KUHN *et al.*, 2000).

As principais espécies causadoras de infecção no homem são o *Enterococcus faecalis* e o *Enterococcus faecium*, as quais possuem pequena sensibilidade aos aminoglicosídeos e à penicilina G, moderada sensibilidade a ampicilina e ao cloranfenicol, mas são bastante sensíveis aos glicopeptídeos (MURRAY, 1990; TAVARES, 2000). Cerca de 85 a 90% dos *Enterococcus* isolados nas clínicas são *E. faecalis* e 5 a 10% são *E. faecium*, sendo este último intrinsecamente mais resistente às penicilinas que o primeiro, pois possui proteínas ligadoras a penicilina (HUYCKE *et al.*, 1998; TAVARES, 2000).

1.1. Costões Rochosos e *Sargassum*

O costão rochoso é considerado um dos mais importantes ecossistemas marinhos e o fital nele presente é primordial para a cadeia trófica, fornecendo energia e matéria orgânica para as comunidades residentes e não residentes deste ecossistema (PEREIRA *et al.*, 2010) (Figura 3).



Fig.3. Costão rochoso em Ubatuba-SP com áreas de *Sargassum* mostrando grande diversidade

As algas marinhas apresentam importância, tanto sob o ponto de vista econômico, como ambiental e social, sendo utilizadas em vários países do mundo, na indústria alimentícia, de medicamentos, da cosmética e agricultura (CABRAL *et al.*, 2011; VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

Algumas espécies de algas encontram uso na avaliação da qualidade dos sistemas aquáticos, para os quais, já foi sugerido um “índice de poluição” baseado nos generos de algas

presentes : quanto menos diversificada a população, maior a poluição do sistema (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

As macroalgas do gênero *Sargassum* pertencem ao Filo Phaeophyta, e a ordem *Fucales*, incluindo cerca de 400 espécies, este Filo inclui todas as demais algas pardas totalizando cerca de 1500 espécies. As algas pardas dominam os costões rochosos ao longo das regiões mais frias do globo, ocorrendo desde o nível da maré baixa até a profundidade de 30m. Em costões com declividade suave, elas podem estender-se por 5 a 10 quilômetros da costa.

Nos trópicos as imensas massas flutuantes de *Sargassum* são denominadas como Mar de Sargaços (RAVEN *et al.*, 2001). O Mar de Sargaços, com superfície de 3,5 milhões de quilômetros quadrados, chega até parte do chamado Triângulo das Bermudas, já no Mar do Caribe (BROW, 2012).

As algas pardas também têm sido utilizadas como adubos, pois sua decomposição é geralmente lenta e seus elementos minerais são liberados progressivamente; uma vez que os polifenóis destas algas têm certa atividade antimicrobiana, essas algas são assim degradadas mais lentamente pelos micro-organismos do solo (REVIERS, 2006).

A presença de vírus em algas pardas foi frequentemente evidenciada. Espécimes infectados foram isolados, cultivados e estudados por Muller e seus colaboradores desde 1988 (ROBLEDO *et al.*, 1994) tendo sido estabelecido o caráter patogênico desses vírus (MULLER & FRENZER, 1993; REVIERS, 2006).

Apesar de serem susceptíveis a contaminantes químicos e microbiológicos, existem poucos estudos na literatura a respeito da contaminação de algas por bactérias; sendo as macroalgas do gênero *Sargassum* potenciais recursos marinhos renováveis, o presente estudo analisou a ocorrência de bactérias indicadoras de contaminação fecal (*Enterococcus* sp e *Escherichia coli*) nestas algas e a resistência destas bactérias a determinados antibióticos.

2. Objetivos

- Avaliar a contaminação por de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli* isoladas da água do mar, de areias de praias recreacionais e de algas do gênero *Sargassum*, em praias do Litoral Norte do Estado de São Paulo: Perequê Mirim, Enseada, e Fortaleza.
- Estudar a influência de fatores abióticos, tais como: temperatura, salinidade e precipitação na contaminação destes ambientes.

3. Materiais e Métodos

3.1. Área de Estudo

A área de estudo (Figura 4) está localizada entre as baías do Flamengo e da Fortaleza, no município de Ubatuba, Litoral Norte do Estado de São Paulo, em uma faixa costeira de cerca de 30 km, assim distribuídos: (a) **Baía da Fortaleza** - Ponta da Fortaleza (S 23° 31' 53,6" / W 45° 09' 41,2"), Praia Bravinha (S 23° 30' 18,6" / W 45° 10' 21,2") e Domingas Dias (S 23° 30' 18,6" / W 45° 10' 21,2"); (b) Baía do Flamengo - Praia da Base (S 23° 29' 48,8" / W 45° 06' 49,9"), **Perequê Mirim** (S 23° 29' 29,0" / W 45° 06' 12,4") e **Praia de Enseada** (S 23° 29' 50,0" / W 45° 04' 58,9"). A distância linear reta entre esses locais varia de 1,6 a 9,2 km, enquanto que a distância considerando as irregularidades da linha de costa varia de 3,1 a 35,0 km.



Fig.4. Localização dos costões rochosos a serem estudados: (1) Ponta da Fortaleza; (2) Perequê-Mirim; (3) Enseada.

3.2. Coleta e processamento de amostras

As amostras do presente trabalho (água, areia e algas) foram coletadas nas praias do Perequê, Enseada (impróprias a maior parte do tempo) e Fortaleza (a qual não tem controle pela CETESB).

3.2.1. Água

As amostras de água foram coletadas durante a maré alta e maré baixa, em frascos estéreis, na isóbata de 1 metro (Figura 5). No momento da coleta foram medidas *in situ* a temperatura e a salinidade, esta última através do uso de um refratômetro portátil (REF211, salinity/ATC- 0-100%) e um termômetro de mercúrio (Incoterm- 0-60°C).

3.2.2. Areia

Em cada praia também foram colhidas, em duplicata, amostras de areia, nos pontos correspondentes às coletas de água, em duas zonas distintas da praia:

- Zona Seca – que normalmente não é banhada pela água do mar e corresponde à área mais frequentada pelos banhistas;
- Zona Úmida – a qual sofre influências das marés sendo local preferido pelas crianças para brincar (Figura 5).

Em cada ponto de coleta de areia, tanto na zona seca quanto na zona úmida, foi considerado um transecto paralelo à linha costeira com três pontos equidistante de coleta de areia para constituir uma amostra composta. Nos dois pontos mediu-se a temperatura utilizando o termômetro (Incoterm- 0-60°C).



Fig.5. Coleta de areia e acondicionamento das amostras de águas e areias sob-refrigeração

3.2.3. Algas do gênero *Sargassum*

As algas foram coletadas na praia do Perequê Mirim em dois pontos P1 (mais próximo à praia) e P2 (mais próximo a mar aberto) nas praias da Enseada e Fortaleza em um único ponto (P1) e armazenadas em sacos plásticos.

As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento do processamento. As amostras coletadas (água, areia e *Sargassum*) foram transportadas sob-refrigeração para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Experimental do Litoral Paulista – Unidade São Vicente, onde foram analisadas.

3.3. Determinação da densidade de *Enterococcus* sp

3.3.1. Amostras de Areia

No laboratório, com o auxílio de uma espátula estéril, as amostras de areia foram pesadas em balança analítica (Bel engineering, precisão de 0,001g) (Figura 6), acondicionadas em erlenmeyers, acrescidas de água destilada estéril (1:10) e submetidas à agitação em um agitador, por cerca de 10 minutos para lavagem e extração das bactérias da areia e obtenção do sobrenadante.

As determinações das densidades de bactérias no sobrenadante foram feitas através da técnica de membrana filtrante (APHA, 2005). Volumes de 10 ml e 50 ml de areia seca e de areia úmida do sobrenadante foram filtrados em membranas de 0,45µm de porosidade. Após a filtração, as membranas foram depositadas em placas contendo meio de cultura Agar mEnterococcus (Dfico).

As placas de Agar mEnterococcus foram incubadas em estufa bacteriológica da marca Olidef cz (Figura 6) a 35 ± 0,5°C por 48h. Após este período, as colônias de coloração vermelho-marrom foram contadas como *Enterococcus* (Figura 6).



Fig.6. Balança analítica, estufa bacteriológica e placa com colônias de *Enterococcus* sp

3.3.2. Amostras de Água

Para análise das densidades bacterianas na água do mar, realizou-se a filtração com os volumes de 10 e 50ml de amostra. O meio de cultura e os procedimentos para incubação e contagem são os mesmos que os utilizados para as amostras de areia (Figura 7).



Fig.7. Procedimentos da técnica de Membrana Filtrante

3. 3.3. Amostras de algas do gênero *Sargassum*

O processamento consistiu, inicialmente, na trituração em um liquidificador simples de 20g de amostra de alga acrescidas de 180 ml de água destilada estéril. O composto foi filtrado em malha fina, com a finalidade de retirar resíduos não triturados (Figura 8).O filtrado foi submetido a técnica da Membrana Filtrante, iniciou-se as filtrações com volumes de 5 e 10ml

e depois passou-se para 1 e 5ml, devido as concentrações serem muito altas para a porosidade da membrana.



Fig.8. Trituração e filtração do *Sargassum* sp

As densidades médias das colônias de bactérias do grupo Enterococos isoladas foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias por 100 ml (UFC 100ml⁻¹) para água do mar e Unidades Formadoras de Colônias por 100g (UFC 100g⁻¹) para a areia e algas.

Com o auxílio de alça de platina estéril, algumas colônias consideradas nas contagens e escolhidas aleatoriamente, de todas as amostras, foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio Enterococcosel Caldo (Becton Dickinson Laboratories) e incubadas a 35 ± 0,5°C por 48h. Os tubos que apresentaram enegrecimento do meio foram considerados positivos.

Após a confirmação de colônias positivas, estas foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio Agar BHI inclinado (Oxoid) para a realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

3.4. Determinação da Densidade de *Escherichia coli*

3.4.1 Amostras de areia

Para o processamento da areia, foram pesados 20 gramas da amostra em balança analítica (Bel engineering), e depositados em frascos contendo 180 ml de água destilada estéril. A amostra foi agitada e ressuspensa por cerca de 10 minutos para a extração das bactérias presentes no sedimento. O sobrenadante foi retirado por meio de pipetas estéreis nos

volumes de 10 ml e 50 ml que foram filtrados e transferidos para placas de Petri com meio mTEC. Estas foram incubadas a $35 \pm 0,5$ °C por 2 horas e em seguida a $44,5 \pm 0,2$ °C por 24 horas em banho Maria. Após o período de incubação contou-se como *E. coli* as colônias de coloração amarela (Figura 9).

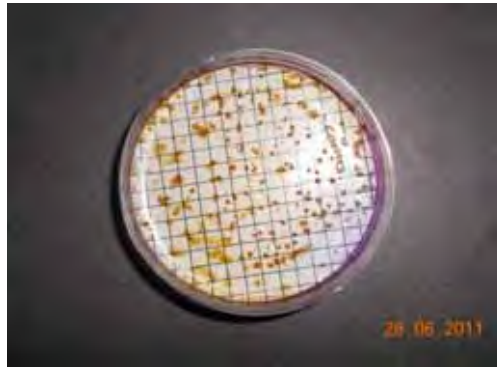


Fig.9. Placa de mTEC com colônias de *Escherichia coli*

3.4.2. Amostras de água

Para a determinação da densidade de *Escherichia coli* também foi utilizada a técnica de Membrana Filtrante (APHA, 2005). Volumes das amostras de água foram filtrados (10 e 50 ml), em membranas de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade e foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Agar mTEC. Estas foram incubadas semelhantemente as placas de areias.

3.4.3. Amostras de algas do gênero *Sargassum*

Utilizou-se o mesmo processo de coleta e extração do método para a densidade de Enterococos. O isolamento, filtração e incubação foram semelhantes aos de água e areias para densidade de *E.coli*.

Para a confirmação dos resultados, uma porcentagem representativa das colônias selecionadas contadas como *E.coli* das amostras de água, areia e *Sargassum* foram submetidas ao teste bioquímico de hidrólise da ureia. As colônias que permaneceram com sua coloração original amarela foram confirmadas como *Escherichia coli* devido à quebra da ureia pela urease produzida por estas bactérias. Os resultados das densidades médias de *Escherichia coli* foram expressos como Unidades Formadoras de Colônias em 100 ml ($\text{UFC } 100 \text{ ml}^{-1}$) para as águas e Unidades Formadoras de Colônias por 100g ($\text{UFC } 100\text{g}^{-1}$) para as areias e algas.

Após a confirmação de colônias positivas, estas foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio Agar BHI inclinado (Oxoid) para a realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

3.5. Meios de cultura utilizados

Agar mEnterococcus (Difco)

Digerido pancreático de caseína.....	12,0g
Peptona de proteose.....	8,0g
Extrato de levedura.....	5,0g
Dextrose.....	2,0g
Fosfato dipotássico.....	4,0g
Azida de sódio.....	0,4g
Agar.....	10,0g
Cloreto de trifeniltetrazólio.....	0,1g

mTEC Agar (Difco)

Fórmula aproximada por litro

Peptona de proteose no. 3	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Lactose	10,0g
Cloreto de sódio	7,5 g
Fosfato monopotássico	1,0g
Fosfato dipotássico	3,3g
Lauril sulfato de sódio.....	0,2g
Sódio Desoxycholate	0,1g
Bromcresol roxo	0,08g
Bromcresol vermelho	0,08g
Agar	15,0g

Enterococcosel Caldo (Becton Dickinson Laboratories)

Caseína digerida por enzimas pancreáticas.....	17,0g
Tecido animal digerido por enzimas pépticas.....	3,0g
Extrato de levedura.....	5,0g
Bilis de boi.....	10,0g

Cloreto de sódio.....	5,0g
Citrato de sódio.....	1,0g
Esculina.....	1,0g
Citrato de amônio férrico.....	0,5g
Azida sódica.....	0,25g

Agar BHI (Oxoid)

Infusão de cérebro de bezerro.....	12,5g
Infusão de bife de coração.....	5,0g
Peptona de proteose.....	10,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Glicose.....	2,0g
Fosfato dissódico.....	2,5g
Agar.....	10,0g

Agar Mueller-Hinton (Difco)

Infusão de carne.....	2,0g
Hidrolisado de caseína.....	17,5g
Amido.....	1,5g
Agar-agar.....	13,0g

3.6. Salinidade, Temperatura e Precipitação

A temperatura da água do mar foi obtida com auxílio de um termômetro de mercúrio (Incoterm- 0-60°C) suspenso na coluna d' água por 5 minutos.

A salinidade da água do mar foi determinada com o auxílio de um refratômetro portátil (REF211, salinity/ATC- 0-100%).

Os valores de precipitação do local de estudo, foram obtidos pela CIIAGRO- Centro integrado de informações agrometeorológicas.

3.7. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Colônias de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp, isoladas da água do mar, da areia e de algas do gênero *Sargassum* foram submetidas aos testes de suscetibilidade a antimicrobianos no Laboratório de Microbiologia da UNESP-São Vicente.

Para os testes de sensibilidade a antimicrobianos foi utilizado o método de antibiograma disco-difusão proposto por Kirby-Bauer, recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003) utilizando o Agar Müller-Hinton.

As colônias de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli* foram submetidas aos seguintes antimicrobianos (Sensifar – Cefar): amoxicilina + ácido clavulânico 30µg, ampicilina 10µg, ciprofloxacina 5µg, eritromicina 15µg, estreptomicina 10µg, gentamicina 10µg, rifampicina 5µg, tetraciclina 30µg e vancomicina 30µg (Figura 10).



Fig.10. Frascos contendo discos impregnados com antimicrobianos

Das culturas mantidas em BHI inclinado (Figura 11), algumas colônias foram escolhidas aleatoriamente e transferidas, com o auxílio de uma alça de platina estéril, para tubos contendo 1 ml de água destilada estéril, em quantidade suficiente para atingir o grau de turvação 0,5, comparativamente a tubo padronizado de acordo com a escala de MacFarland (Bier, 1994).

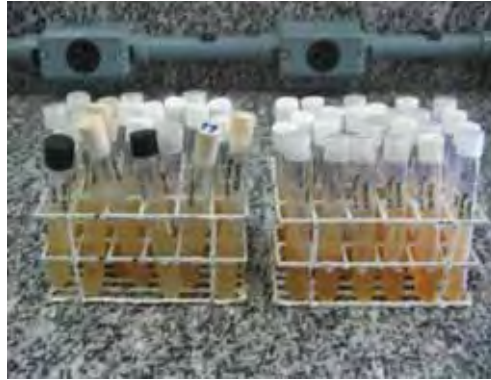


Fig.11. Colônias de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli* em Agar BHI inclinado.

Esta escala é utilizada para aferir uma suspensão bacteriana mediante o grau de turvação e consiste numa série de 10 tubos de turvação crescente, obtidos pela mistura de soluções de cloreto de bário (BaCl_2) a 1% e de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1% em quantidades variáveis.

A densidade dos inóculos a serem usados para o teste de sensibilidade foi padronizada utilizando-se um controle de turbidez de BaSO_4 , equivalente a uma solução padrão de MacFarland 0,5, que foi preparada acrescentando-se uma alíquota de 0,5ml de BaCl_2 0,048 mol l^{-1} (1,175% w/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5 ml de H_2SO_4 0,18 mol l^{-1} (1% v/v), homogeneizando constantemente para manter a suspensão. A solução de sulfato de bário foi, então, transferida para tubos do mesmo tipo e tamanho daqueles usados para diluir o inóculo bacteriano, devidamente selados e armazenados em local escuro, à temperatura ambiente.

Os inóculos foram preparados imediatamente antes do início de cada teste. Após o ajustamento de sua turbidez, introduziu-se em cada inóculo um “swab” de algodão estéril, girando-o várias vezes a apertando-o firmemente contra a parede interna do tubo, a fim de retirar qualquer excesso de inóculo do swab.

A superfície seca da placa de Agar Müeller-Hinton foi inoculada esfregando o swab em toda ela, procedimento que foi repetido outras duas vezes, girando a placa cerca de 60° cada vez, assegurando a distribuição uniforme do inóculo. Posteriormente, a placa foi tampada para que houvesse uma completa absorção do excesso de umidade.

Com o auxílio de uma pinça previamente flambada, os discos de antimicrobianos foram distribuídos de forma equidistante sobre a superfície da placa, evitando que a distância de centro para centro não excedesse 24 mm. Após este procedimento, as placas foram invertidas e colocadas em estufa a 35°C por 16-18 horas.

Passado o período de incubação, as amostras foram analisadas quanto à presença ou ausência de halos de inibição. Nos casos em que houve formação de halos de inibição, os

diâmetros foram medidos em milímetros com o auxílio de uma régua, incluindo o diâmetro do disco.

Realizou-se a medição encostando-se a régua na parte de trás da placa de Petri invertida, a qual estava sobre um fundo não refletor. As medidas obtidas dos halos foram comparadas com valores já conhecidos, especificados na tabela padrão fornecida pelo fabricante dos discos de papel (Tabelas 2 e 3).

De acordo com os diâmetros encontrados (Figura 12), pôde-se estabelecer o grau de suscetibilidade das bactérias aos antimicrobianos testados, verificando se os organismos são sensíveis, intermediários ou resistentes.

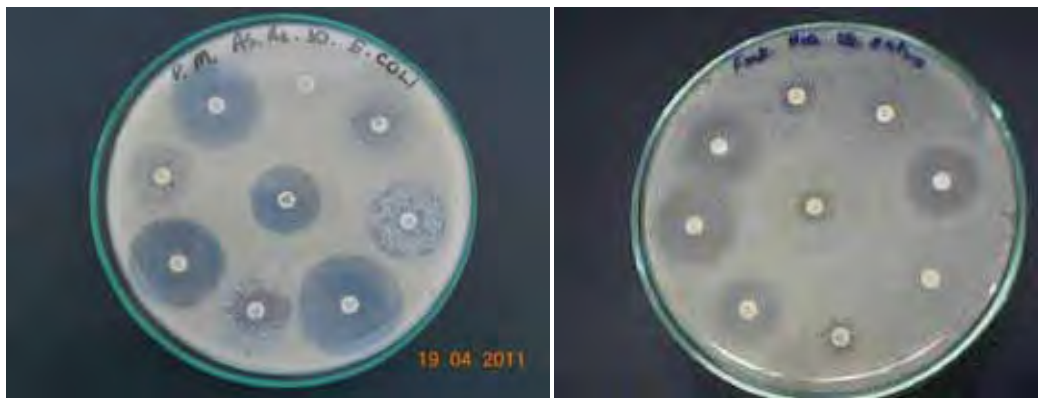


Fig.12. Placas de antibiogramas mostrando halos de *Escherichia coli* e *Enterococcus sp* respectivamente

Tabela 2 – Tabela padrão para interpretação de halos de inibição para *Enterococcus sp* (NCCLS, 2011).

Antibacterianos	Padrão Interpretativo (mm)		
	Resistente	Intermediária	Sensível
Amoxicilina + Ac. Clavulânico (AMC)	14	15-16	17
Ampicilina (AMP)	16	-	17
Ciprofloxacino (CIP)	15	16-20	21
Eritromicina (ERI)	13	14-22	23
Estreptomicina (EST)	11	12-14	15
Gentamicina (GEN)	12	13-14	15
Rifampicina (RIF)	16	17-19	20
Tetraciclina (TET)	14	15-18	19
Vancomicina (VAN)	14	15-16	17

Tabela 3 – Tabela padrão para interpretação de halos de inibição para *Escherichia coli* (NCCLS, 2011).

Antibacterianos	Padrão Interpretativo (mm)		
	Resistente	Intermediária	Sensível
Amoxicilina + Ac. Clavulânico (AMC)	17	18-24	25
Ampicilina (AMP)	15	16-22	23
Ciprofloxacina (CIP)	29	30-40	41
Eritromicina (ERI)	13	14-17	18
Estreptomicina (EST)	11	12-20	21
Gentamicina (GEN)	18	19-26	27
Rifampicina (RIF)	7	8-10	11
Tetraciclina (TET)	17	18-25	26
Vancomicina (VAN)	9	10-11	12

A categoria “sensível” significa que uma infecção por uma determinada cepa pode ser tratada adequadamente com a dose do agente antimicrobiano recomendada, exceto quando contra-indicado. A categoria “intermediária” implica que uma infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente em locais do corpo onde as drogas se concentram fisiologicamente ou quando for possível a prescrição de uma dosagem mais alta da droga que a habitual. Por fim, as cepas “resistentes” não são inibidas pelas concentrações do agente antimicrobiano normalmente prescritas em tratamentos habituais (frequência e dosagem) e/ou caem na faixa em que a ocorrência de mecanismos de resistência antimicrobiana específicos são mais prováveis, e a eficácia clínica não tem sido confiável em estudos clínicos (NCCLS, 2011).

3.8. Análise estatística

A partir dos resultados de densidades de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp, temperaturas das águas e areias, salinidades e dos valores de precipitação, foi realizada análise de correlação entre esses parâmetros a partir do coeficiente de correlação de Pearson, com nível de significância 5%. Também foi analisada a variação entre as três praias através da análise de variância teste de Friedman também com 5% de significância.

4. Resultados

4.1. Densidade de *Escherichia coli* em água

A legislação CONAMA n° 274/2000 estabelece que valores de densidade de bactérias *Escherichia coli* na água do mar maiores ou iguais a $2000 \text{ UFC}100\text{ml}^{-1}$ na última amostragem classificam a praia como imprópria ao banho. Nas amostras de água analisadas o valor estabelecido pelo CONAMA foi ultrapassado no mês de junho ($2,400 \times 10^3 \text{ UFC}100\text{ml}^{-1}$) e outubro ($2,300 \times 10^3 \text{ UFC}100\text{ml}^{-1}$) na praia do Perequê Mirim (Figura 13).

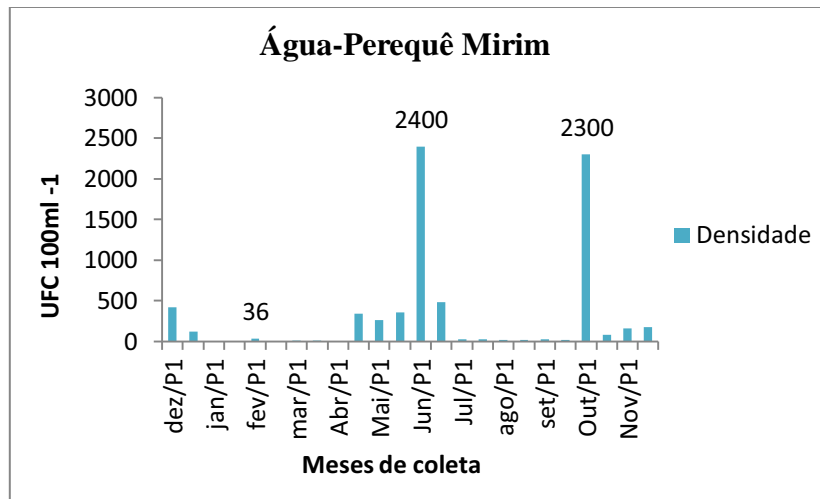


Fig.13. Densidade de *Escherichia coli* em água na Praia do Perequê Mirim

Na praia da Enseada, as densidades atingiram seus valores máximos no mês de maio ($1,300 \times 10^3 \text{ UFC}100\text{ml}^{-1}$ no ponto 1 e $900 \text{ UFC}100\text{ml}^{-1}$ no ponto 2); estes valores não ultrapassaram o valor limite estabelecido na legislação ($2000 \text{ UFC}100\text{ml}^{-1}$) para considerar a praia como imprópria (Figura 14).

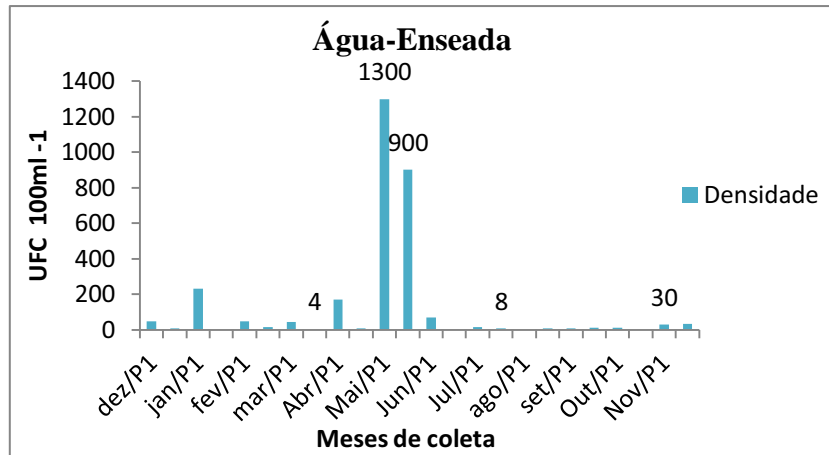


Fig.14. Densidade de *Escherichia coli* em água na Praia da Enseada

Já na praia da Fortaleza, a maior densidade ocorreu no mês de maio com um valor de 800 UFC100ml⁻¹ a qual pode ser considerada como própria segundo a legislação CONAMA 274/2000 para as densidades de *Escherichia coli* (Figura 15).

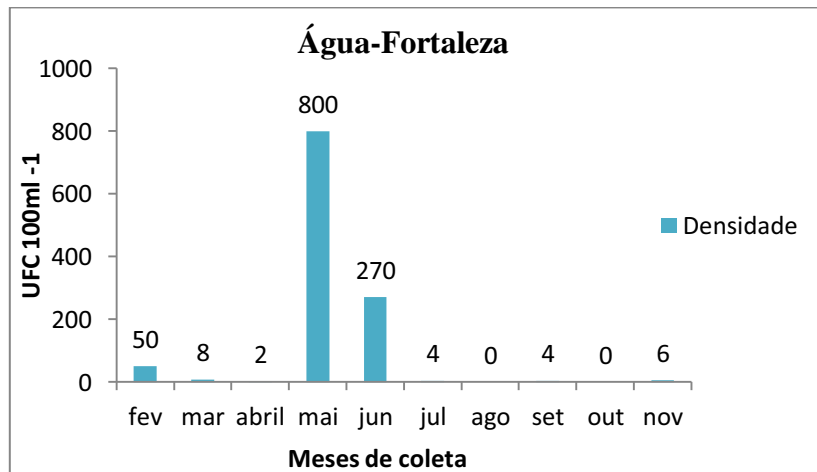


Fig.15. Densidade de *Escherichia coli* em água na Praia da Fortaleza

4.2. Densidade de *Escherichia coli* em areias

As amostras de areias da praia do Perequê Mirim apresentaram altas densidades de *Escherichia coli*, com picos de $9,091 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ para a areia úmida no mês de agosto e $5,036 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ para a areia seca no mês de junho. As concentrações permaneceram altas entre os meses de abril a novembro com valores de densidades que ultrapassam o valor que é estabelecido na legislação para a água (2000 UFC100ml⁻¹) (Figura 16).

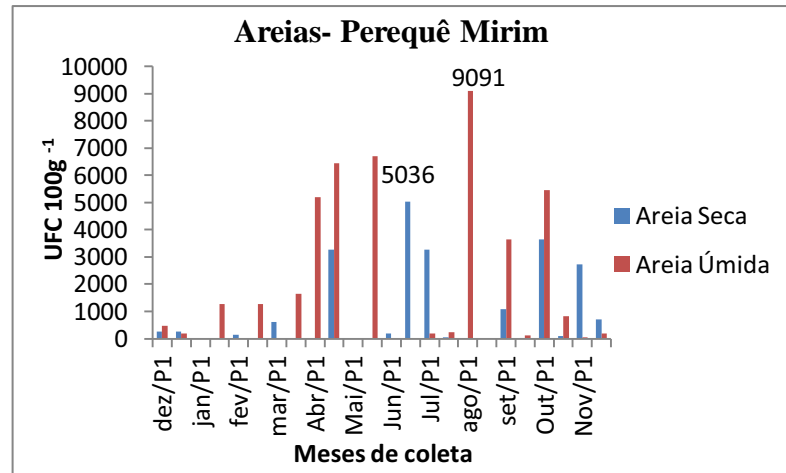


Fig.16. Densidade de *Escherichia coli* em areias na Praia do Perequê Mirim

Na praia da Enseada os valores de densidades foram bem mais elevados nas areias em relação às amostras de água, com picos de $7,810 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ para areia úmida no mês de maio e $7,300 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ para areia seca no mês de junho. Estas densidades permaneceram altas até o final do período de estudo (Figura 17).

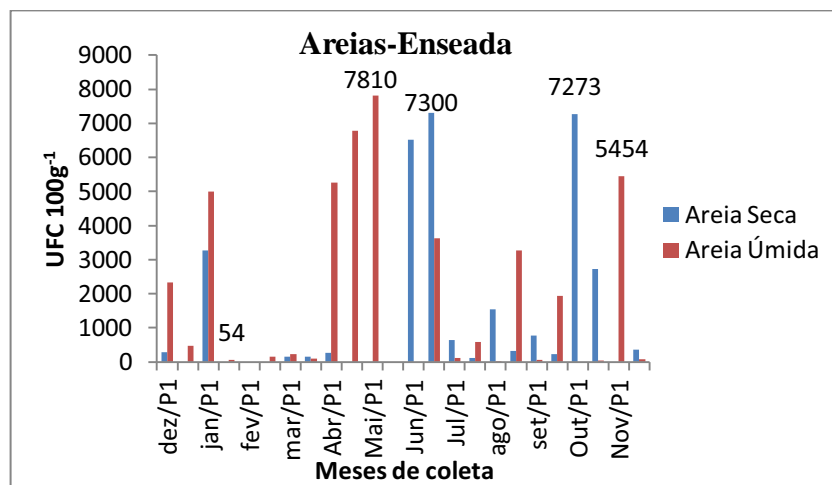


Fig.17. Densidade de *Escherichia coli* em areias na Praia da Enseada

Para a praia da Fortaleza as densidades de *Escherichia coli* em areias também foram maiores em relação às amostras de água, com picos de $6,281 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ para areia seca e $3,818 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ para areia úmida no mês de junho. Observou-se uma diminuição nas densidades nos meses seguintes, entretanto as densidades na areia úmida aumentaram nos meses de outubro ($2,364 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹) e novembro ($3,272 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹) (Figura 18).

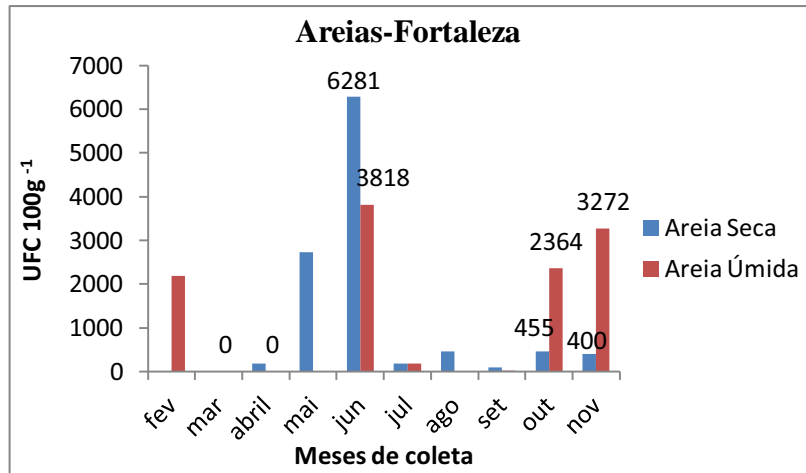


Fig.18. Densidade de *Escherichia coli* em areias na Praia da Fortaleza

4.3. Densidade de *Escherichia coli* em algas *Sargassum* sp

As concentrações em algas do gênero *Sargassum* foram altas em todo o período de estudo, com densidades muito altas e superiores a legislação estabelecida para a água, com picos de $6,872 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ para o *Sargassum* do P1 (Frente do costão) no mês de maio e $9,134 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ para o *Sargassum* do P2 (ponta do costão) no mês de agosto (Figura 19).

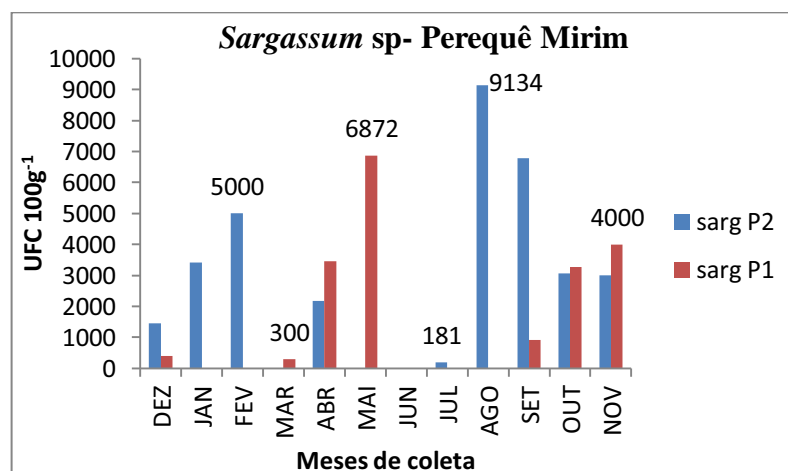


Fig.19. Densidade de *Escherichia coli* em *Sargassum* sp na Praia do Perequê Mirim

Nas amostras da praia da Enseada o *Sargassum* foi coletado em um único ponto P1 na frente do costão, e estas apresentaram altas densidades de *E.coli*, com exceção dos meses de abril e maio e de julho a setembro onde a concentração foi nula, os meses de junho e outubro tiveram as maiores concentrações com valores de $4,909 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ e $7,636 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ respectivamente (Figura 20).

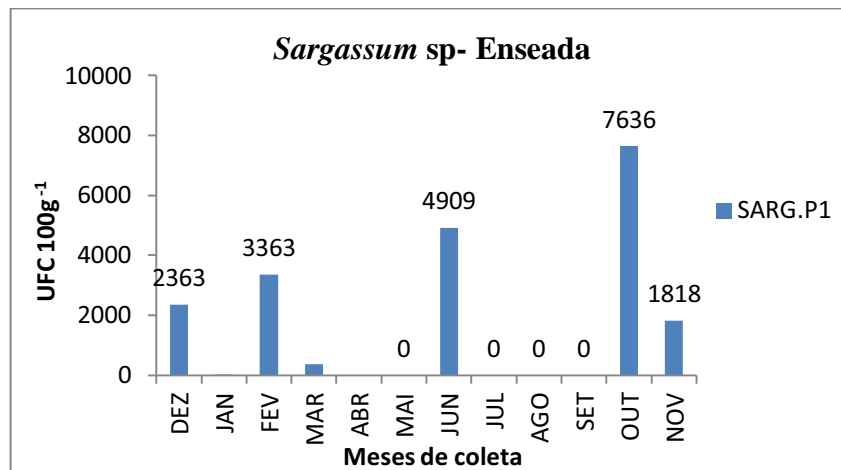


Fig.20. Densidade de *Escherichia coli* em *Sargassum* sp na Praia da Enseada

Na praia da Fortaleza o *Sargassum* foi coletado em apenas cinco meses (de junho a outubro) em um único ponto P1 (frente do costão). Neste período de junho a setembro as concentrações foram nulas. Em outubro ocorreu alta densidade ($2,182 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹) (Figura 21).

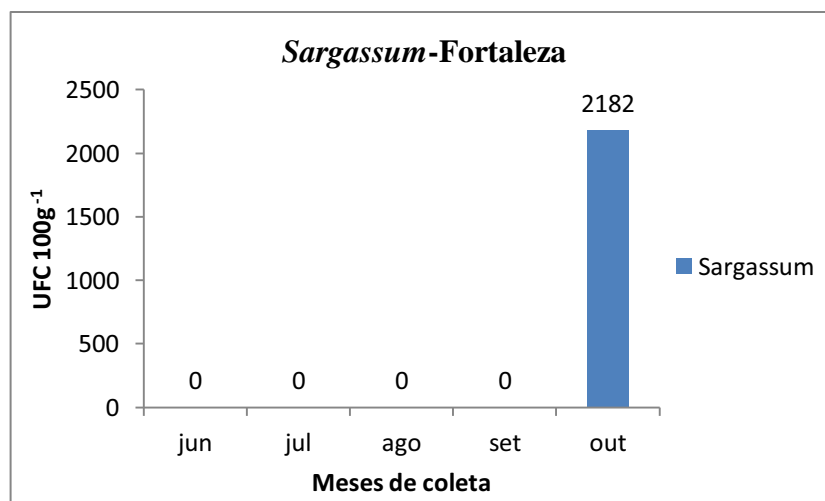


Fig.21. Densidade de *Escherichia coli* em *Sargassum* sp na Praia da Fortaleza

4.4. Densidade de *Enterococcus* sp em água

Para a praia ser considerada como própria a resolução CONAMA 274/2000 estabelece valores de densidades de *Enterococcus* sp de no máximo 100 UFC100ml⁻¹ em duas ou mais amostras em cinco semanas consecutivas e 400 UFC100ml⁻¹ na última medição. Acima destes valores ela se encontrará imprópria ao banho. Neste trabalho fizemos uma única coleta, portanto considerando-se o valor de 400 UFC100ml⁻¹ para caracterizar a praia do Perequê Mirim esta não ultrapassou o valor estabelecido para ser considerada como imprópria, podendo ser considerada como própria nos dias da coleta. Apresentou uma maior concentração no mês de dezembro/2011 (228 UFC100ml⁻¹) (Figura 22).

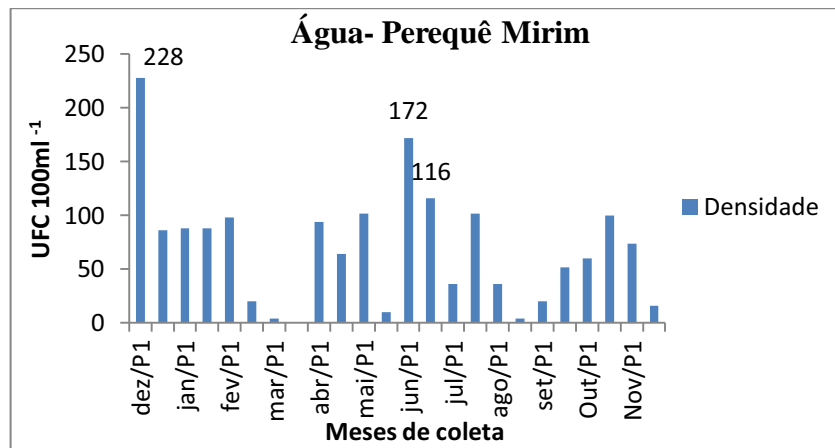


Fig.22. Densidade de *Enterococcus* sp em água na praia do Perequê Mirim

Na praia da Enseada as densidades de *Enterococcus* sp não ultrapassaram o valor de 400 UFC100ml⁻¹, podendo ser considerada como própria nos dias de coleta. Apresentou maior densidade no mês de julho (218 UFC100ml⁻¹) (Figura 23).

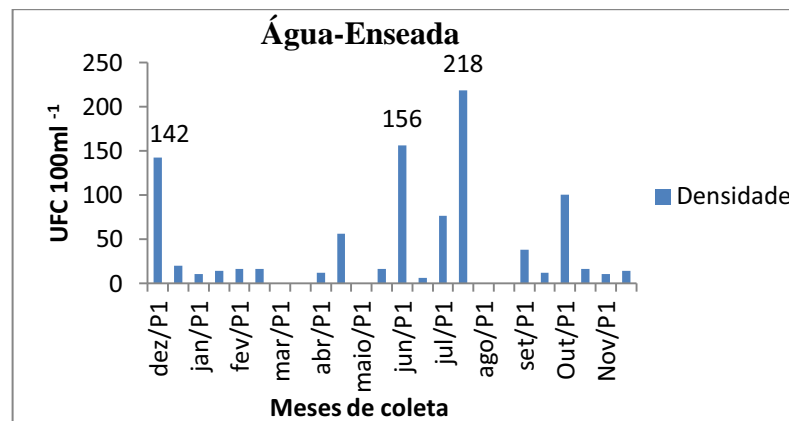


Fig.23. Densidade de *Enterococcus* sp em água na praia da Enseada

Baixas densidades de *Enterococcus* sp foram encontradas na praia da Fortaleza, com uma maior concentração em abril (200 UFC100ml⁻¹) e junho (112 UFC100ml⁻¹) (Figura 24).

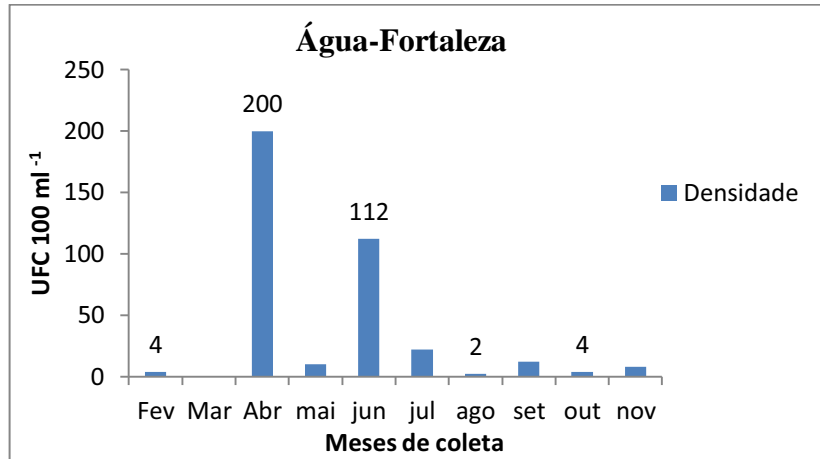


Fig.24. Densidade de *Enterococcus* sp em água na praia da Fortaleza

4.5. Densidade de *Enterococcus* sp em areias

Os resultados das análises das amostras de areias em relação à contaminação por *Enterococcus* sp na praia do Perequê Mirim foram altos e bem maiores quando comparados com os resultados das análises da água. Estes valores ultrapassaram o valor estabelecido na legislação para a concentração na água (400 UFC100ml⁻¹). Os maiores picos foram para areia úmida em junho (1,691x10³ UFC100ml⁻¹) e areia seca em julho (1,509x10³ UFC100ml⁻¹) (Figura 25).

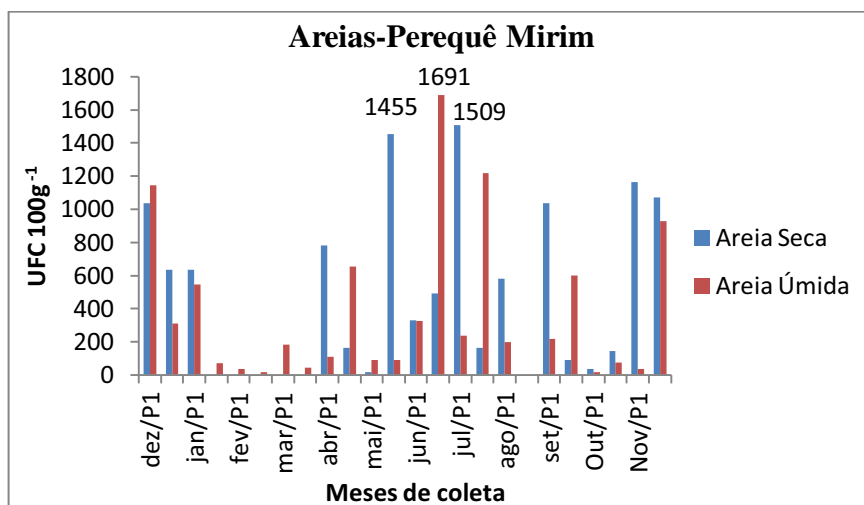


Fig.25. Densidade de *Enterococcus* sp em areias na praia do Perequê Mirim

As areias da praia da Enseada apresentaram altas concentrações de *Enterococcus* sp, principalmente a areia seca que apresentou uma maior densidade no mês de junho ($5,273 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹). A areia úmida também teve um pico de densidade no mês de junho (945 UFC100ml⁻¹). As densidades na areia seca permaneceram altas até outubro e as de areia úmida diminuíram até o final do estudo (Figura 26).

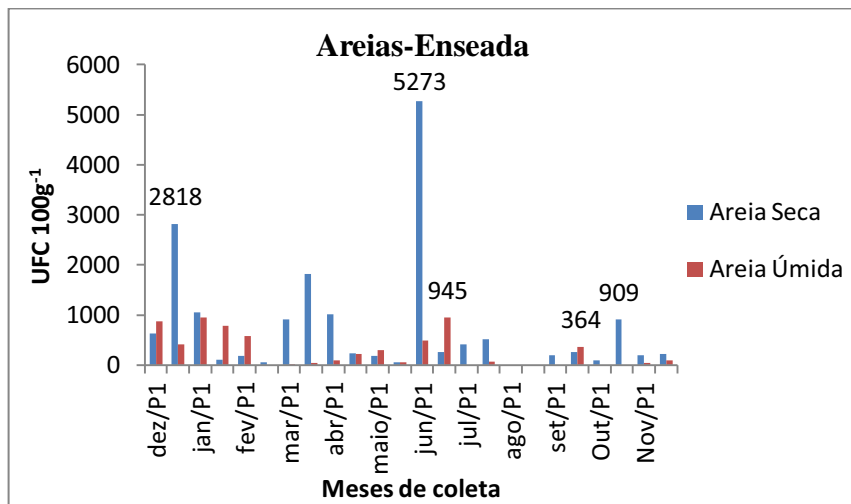


Fig.26. Densidade de *Enterococcus* sp em areias na praia da Enseada

Nas areias da praia de Fortaleza foram relativamente baixas comparando-se com as outras duas praias, com exceção do mês de junho que apresentou altas densidades tanto para areia úmida ($2,109 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹) quanto para areia seca (982 UFC100ml⁻¹) (Figura 27).

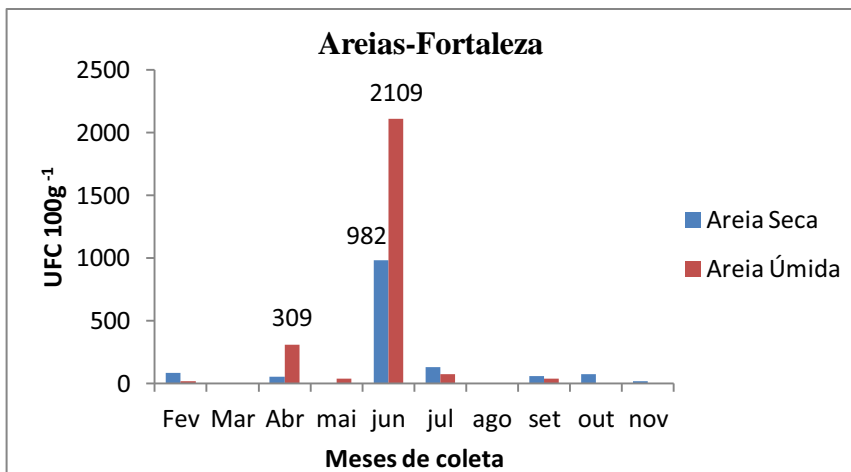


Fig.27. Densidade de *Enterococcus* sp em areias na praia da Fortaleza

4.6. Densidade de *Enterococcus* sp em algas *Sargassum* sp

As densidades de *Enterococcus* encontradas no *Sargassum* da praia do Perequê Mirim foram muito altas em todo o período tanto para o *Sargassum* da frente do costão (P1) quanto aquele da ponta do costão (P2). Para o *Sargassum* do ponto P1 a maior concentração foi em junho ($3,636 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹) e para P2 este pico foi em dezembro/2011 chegando a $4,800 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ (Figura 28).

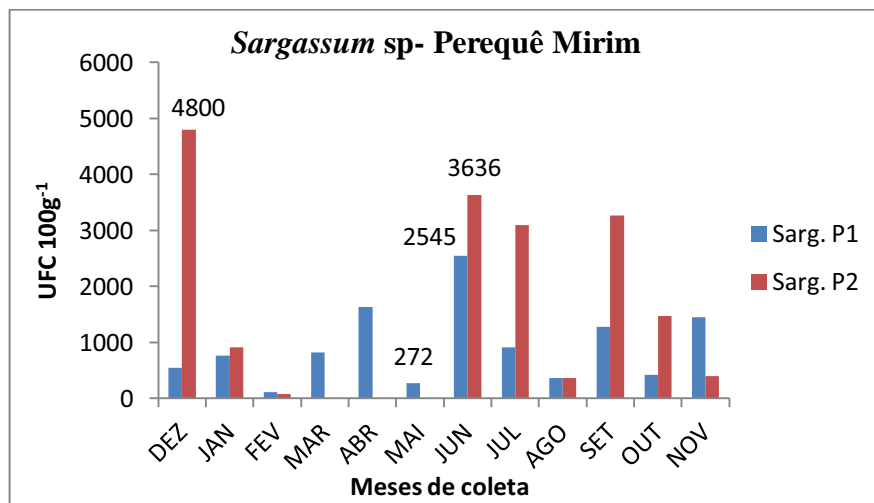


Fig.28. Densidade de *Enterococcus* sp em algas *Sargassum* sp na praia do Perequê Mirim

O *Sargassum* da praia da Enseada coletado em um único ponto, apresentou altas densidades de abril a novembro, com valores de $3,272 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ e $3,636 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ para os meses de abril e julho respectivamente (Figura 29).

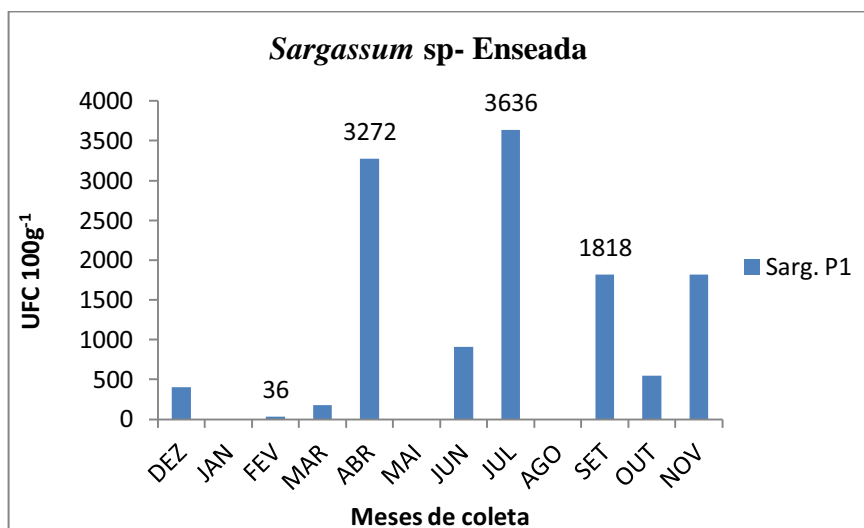


Fig.29. Densidade de *Enterococcus* sp em algas *Sargassum* sp na praia da Enseada

O *Sargassum* na praia da Fortaleza foi coletado de junho a outubro, também em um único ponto (frente do costão). As amostras apresentaram em geral altas densidades de *Enterococcus* sp, com exceção do mês de agosto onde as densidades foram nulas. A maior densidade ocorreu no mês de julho ($5,636 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹) (Figura 30).

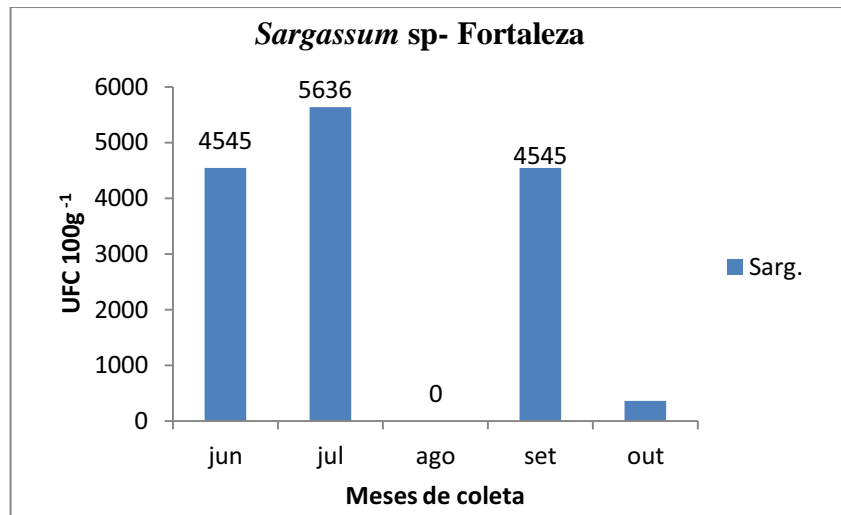


Fig.30. Densidade de *Enterococcus* sp em algas *Sargassum* sp na praia da Fortaleza

4.7. Relação entre a Densidade de *Escherichia coli* e fatores abióticos: temperatura, salinidade e precipitação

A salinidade da água de Perequê Mirim apresentou pequenas variações no período de estudo, sendo que observou-se uma maior densidade de *Escherichia coli* para salinidades mais baixas. Em relação à temperatura verificou-se uma relação inversa, com maior densidade de bactérias no mês de junho (Figura 31). No caso da areia seca, verificou-se também uma relação negativa entre a densidade das bactérias e a temperatura, pois nos meses de menor temperatura (24,5°C) observou-se um pico na densidade ($5,036 \times 10^3$ UFC100g⁻¹). No mês de outubro observou-se novamente um aumento na densidade ($3,636 \times 10^3$ UFC100g⁻¹) a temperatura de 27,7°C (Figura 32). Para a areia úmida verificou-se uma maior densidade no mês de agosto ($9,091 \times 10^3$ UFC100g⁻¹) à temperatura de 27°C. Em geral a correlação entre a densidade de *Escherichia coli* e a temperatura foi negativa (Figura 33).

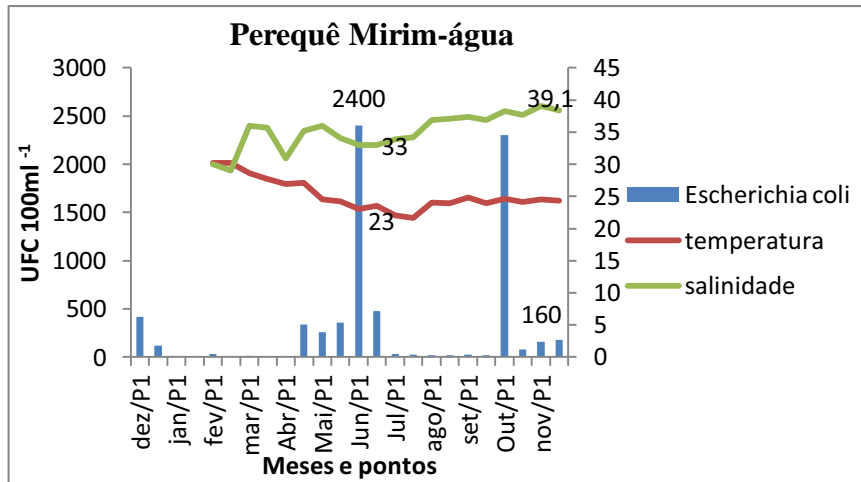


Fig.31. Variação da densidade de *Escherichia coli* na água em relação à temperatura e salinidade

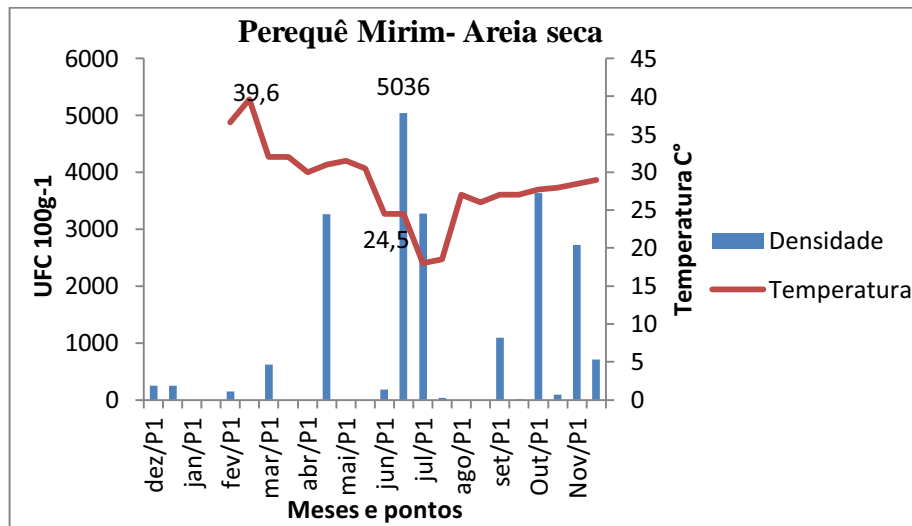


Fig.32. Variação da densidade de *Escherichia coli* em areia seca com a temperatura

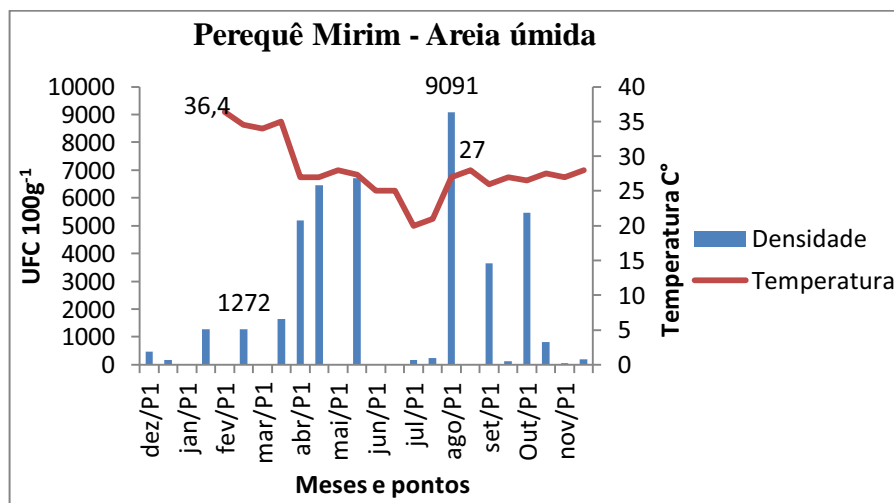


Fig.33. Variação da densidade de *Escherichia coli* em areia úmida com a temperatura

As densidades de *E.coli* em água e areias (seca e úmida) da praia Perequê Mirim comparadas com a precipitação (tabela 4) mostraram uma relação negativa, onde a maior densidade na água foi em junho de $2,400 \times 10^3$ UFC100ml⁻¹ com uma média de precipitação mensal de 92mm, na areia seca também em junho com $5,036 \times 10^3$ UFC100g⁻¹ e na areia úmida em agosto com $9,091 \times 10^3$ UFC100g⁻¹ para uma precipitação média mensal de 26,3 mm (Figura 34).

Tabela. 4. Médias mensais de volumes de precipitação de dezembro/2011 a novembro/2012 (CIIAGRO, 2012)

Meses	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
Precipitação (mm)	436,7	254,8	80,9	235,7	99,6	185	92	129,3	26,3	58,1	164,4	262,4

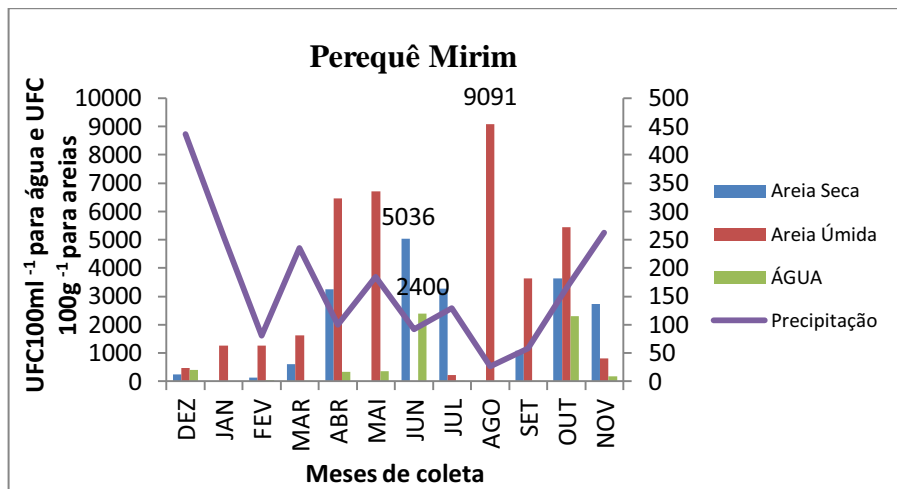


Fig.34. Variação da densidade de *Escherichia coli* em águas e areias com a precipitação

Não houve relação entre as densidade de *Escherichia coli* e a precipitação para o *Sargassum* sp do P1. Para o *Sargassum* sp do P2 a relação foi negativa, pois a densidade de *E.coli* com a diminuiu com a precipitação (Figura 35).

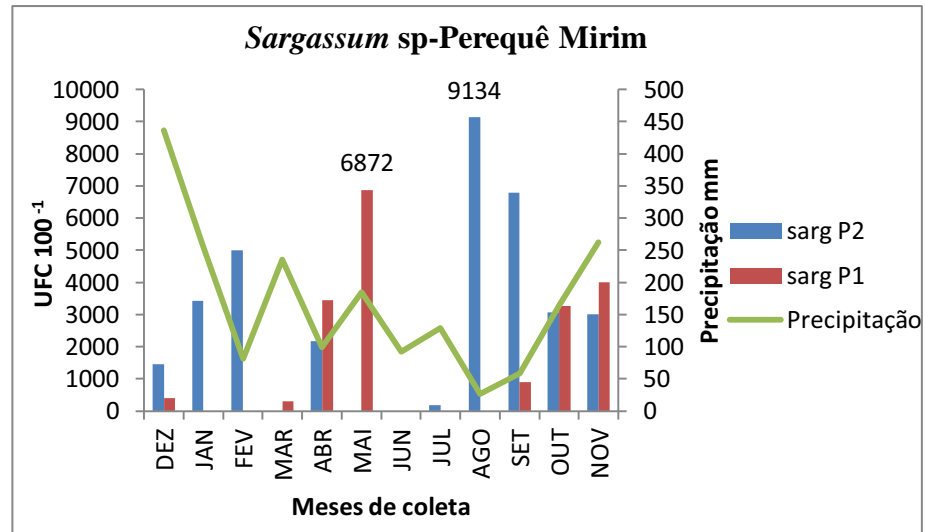


Fig.35. Variação da densidade de *Escherichia coli* em *Sargassum sp* com a precipitação

Na praia da Enseada, as análises dos valores para as densidades de *Escherichia coli* em água, mostraram uma relação negativa tanto para a salinidade quanto para a temperatura (Figura 36). Para a areia seca os valores mostraram uma relação negativa da densidade com a temperatura, com maiores valores de densidade em junho $7,300 \times 10^3$ UFC100g⁻¹ e outubro $7,273 \times 10^3$ UFC100g⁻¹ ambos para a temperatura de 25°C, em temperaturas mais elevadas observou-se uma menor densidade (Figura 37). Na areia úmida também foi verificado uma relação negativa entre as densidades de *E.coli* e a temperatura, com o maior pico de densidade em maio de $7,810 \times 10^3$ UFC100g⁻¹ na temperatura de 26°C (Figura 38).

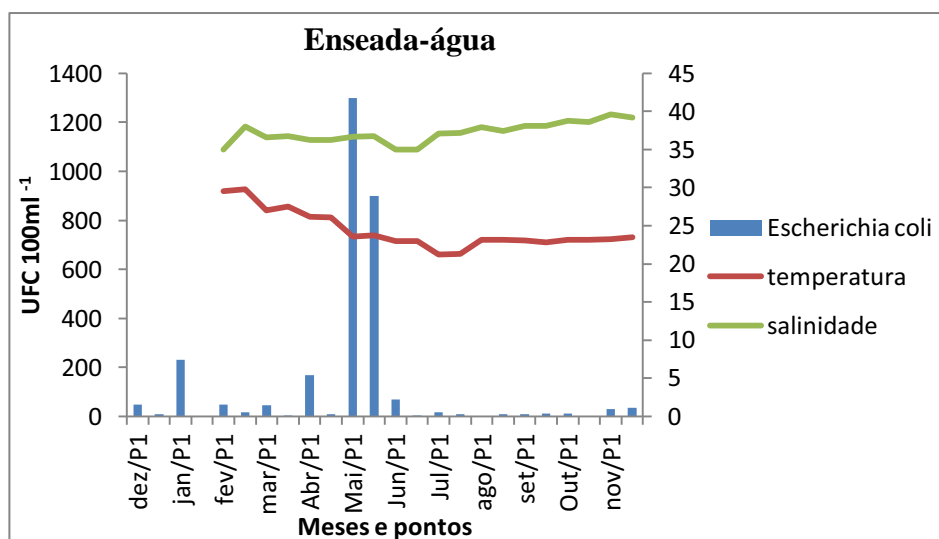


Fig.36. Variação da densidade de *Escherichia coli* na água com a temperatura e salinidade

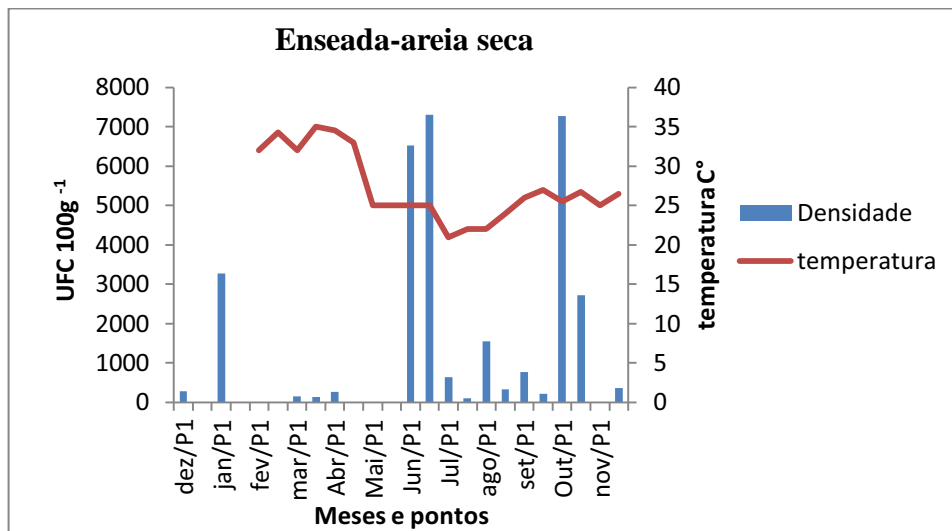


Fig.37. Variação da densidade de *Escherichia coli* na areia seca com a temperatura

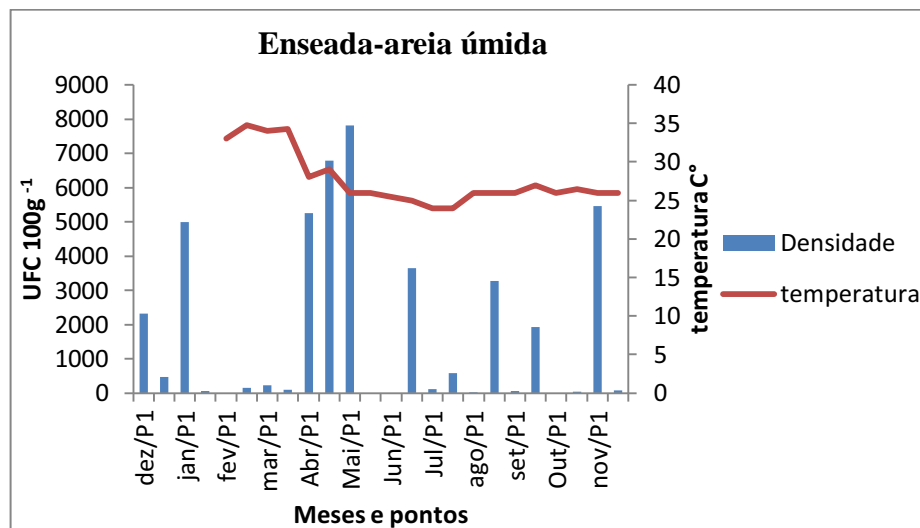


Fig.38. Variação da densidade de *Escherichia coli* na areia úmida com a temperatura

A relação das densidades de *E.coli* com os volumes de precipitação mostraram que não houve relação significativa para a água e areia úmida. Entretanto para as densidades na areia seca esta relação mostrou-se negativa, com um picos de densidades em junho de $7,300 \times 10^3$ UFC100g⁻¹ e média de precipitação mensal de 92 mm (Figura 39).

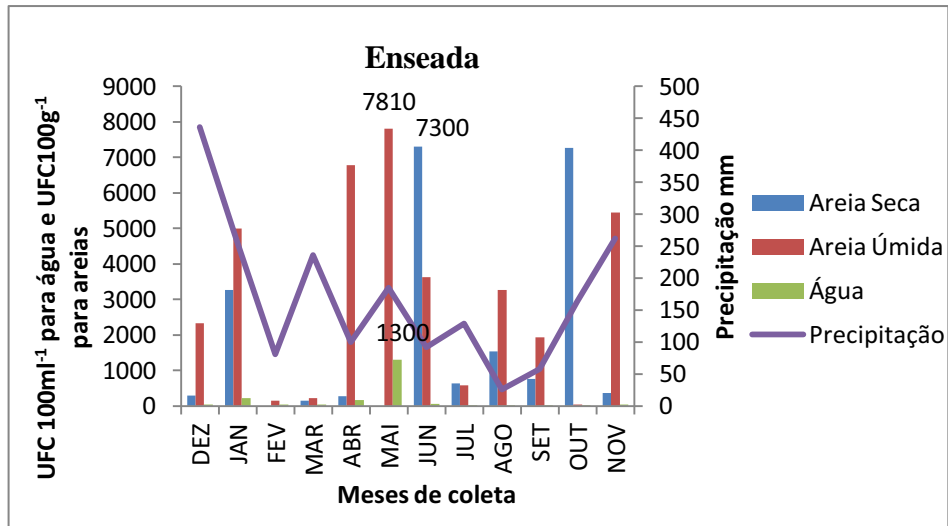


Fig.39. Variação da densidade de *Escherichia coli* em água e areias com a precipitação

As densidades de *Escherichia coli* em *Sargassum* sp mostraram uma relação positiva com os valores de precipitação, ou seja quanto maior foi a precipitação maior a densidade de bactérias, com um pico em outubro de densidade de $7,636 \times 10^3$ UFC100g⁻¹ com média mensal de precipitação de 164,4 mm (Figura 40).

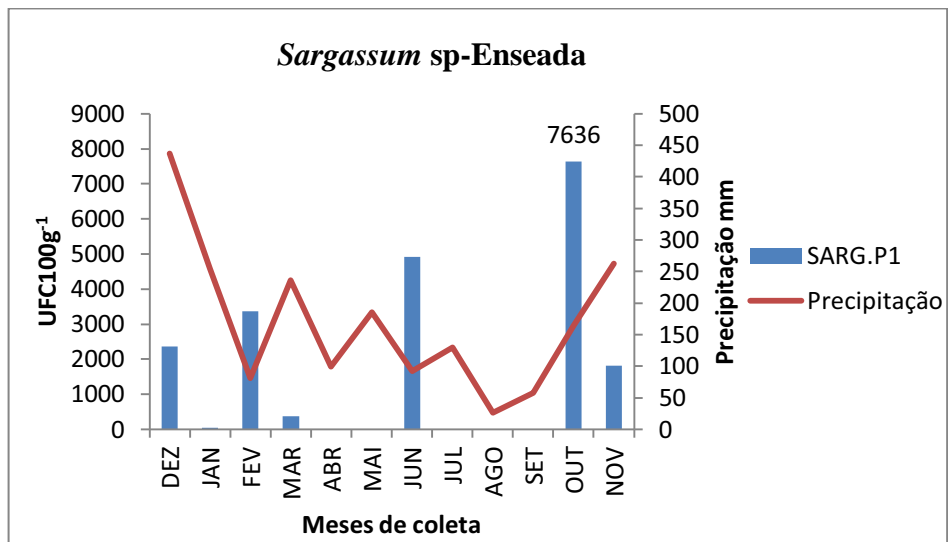


Fig.40. Variação da densidade de *Escherichia coli* em *Sargassum* sp com a precipitação

Na praia da Fortaleza observou-se uma relação negativa da densidade tanto com a salinidade como para a temperatura (Figura 41). Na areia seca também se verificou-se uma relação negativa com a temperatura, com maior densidade em junho de $6,281 \times 10^3$ UFC100g⁻¹ à temperatura de 22°C (Figura 42). A areia úmida também mostrou relação negativa da densidade com a temperatura, sendo o pico de densidade em junho de $3,818 \times 10^3$ UFC100g⁻¹ e temperatura de 23°C (Figura 43).

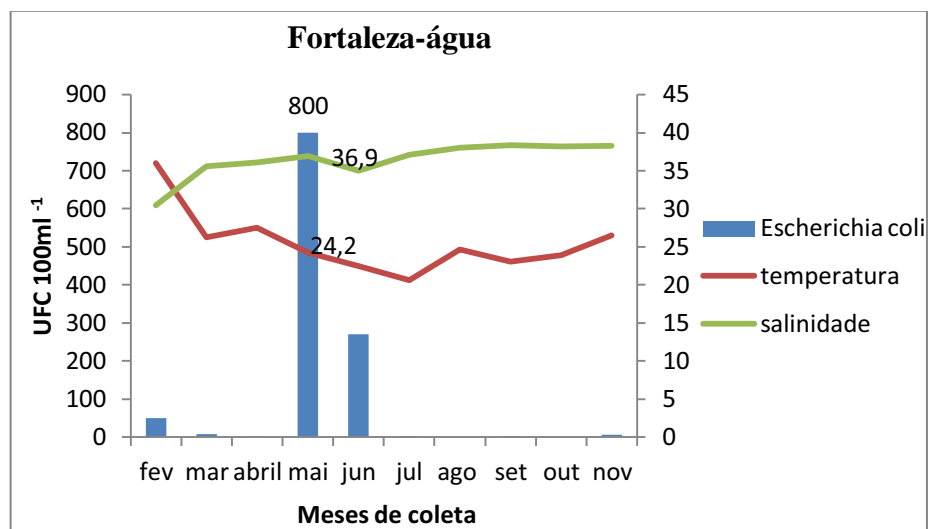


Fig.41. Variação da densidade de *Escherichia coli* em água com temperatura e salinidade

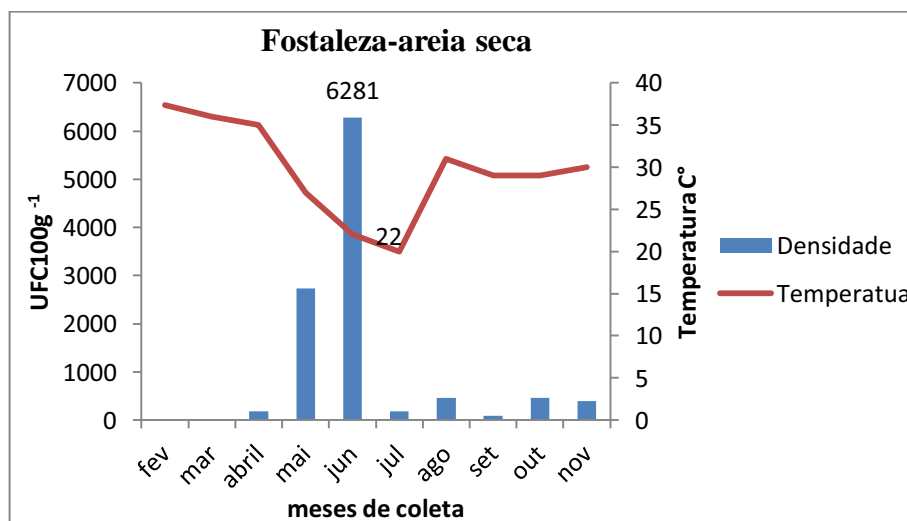


Fig.42. Variação da densidade de *Escherichia coli* na areia seca com a temperatura

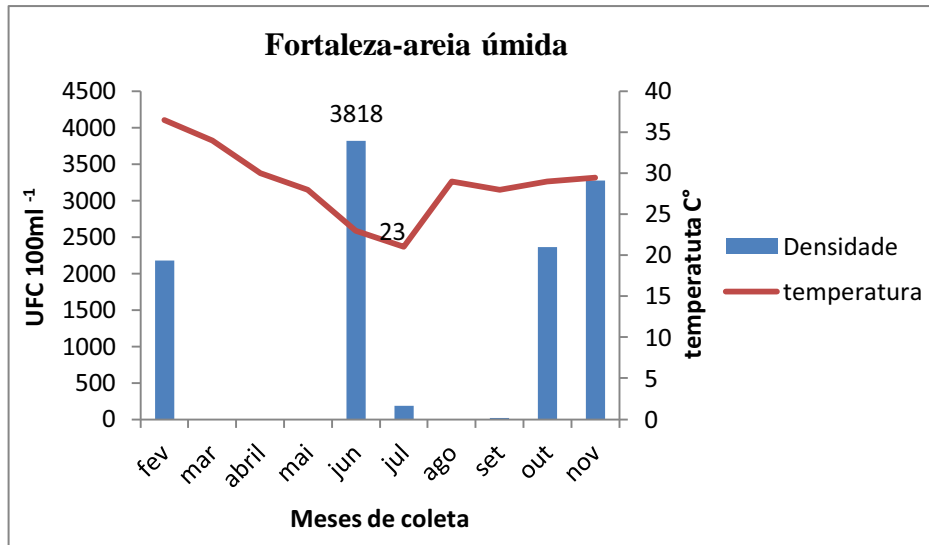


Fig.43. Variação da densidade de *Escherichia coli* na areia úmida com a temperatura

A comparação dos dados de precipitação mostrou que não houve relação com as densidades de *Escherichia coli* na água e na areia úmida, já com a areia seca houve relação negativa, sendo a maior densidade em junho $6,281 \times 10^3 \text{UFC}100\text{g}^{-1}$ com média mensal de precipitação de 92 mm. Não houve correlação para as densidades de *E.coli* em *Sargassum* com os volumes de precipitação (Figura 44).

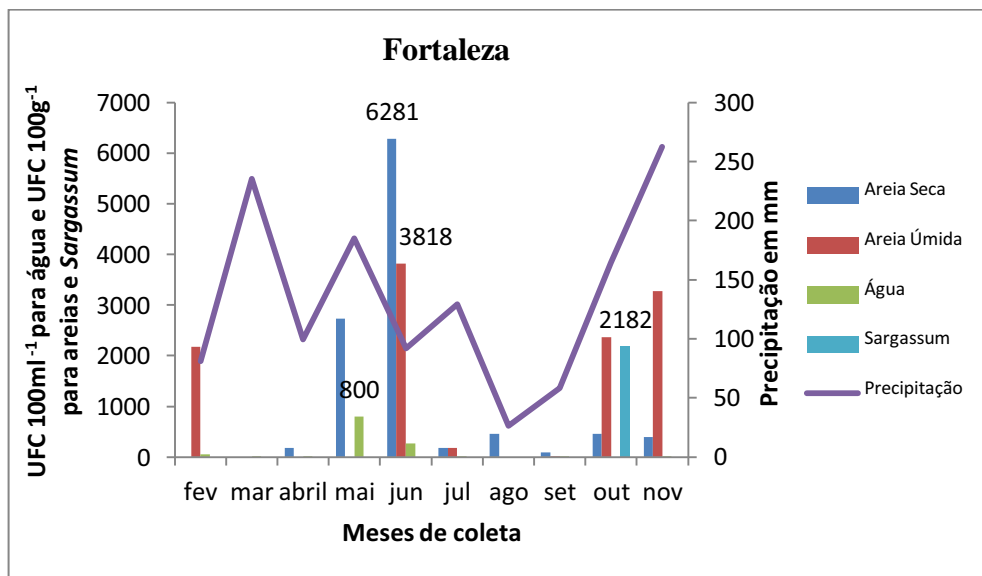


Fig.44. Variação da densidade de *Escherichia coli* em água, areias e *Sargassum* com a precipitação

4.8. Relação entre a Densidade de *Enterococcus* sp e fatores abióticos: temperatura, salinidade e precipitação

A densidade de *Enterococcus* sp na água da praia do Perequê Mirim apresentou uma relação negativa a salinidade. Em junho a densidade foi de 172 UFC100ml⁻¹ para uma salinidade de 33%, e em novembro em salinidade mais alta, 39,1%, a densidade caiu para 74 UFC100ml⁻¹. Também houve uma relação negativa das densidades com a temperatura (Figura 45). Os resultados das areias mostraram que estas também apresentaram uma relação negativa das densidades de *Enterococcus* sp com a temperatura, ou seja, as densidades foram maiores em temperatura menores. A areia seca teve um pico na densidade em julho (1,509x10³UFC100g⁻¹) em temperatura de 18°C (Figura 46) e a areia úmida em junho (1,691x10³UFC100g⁻¹) em temperatura de 25°C (Figura 47).

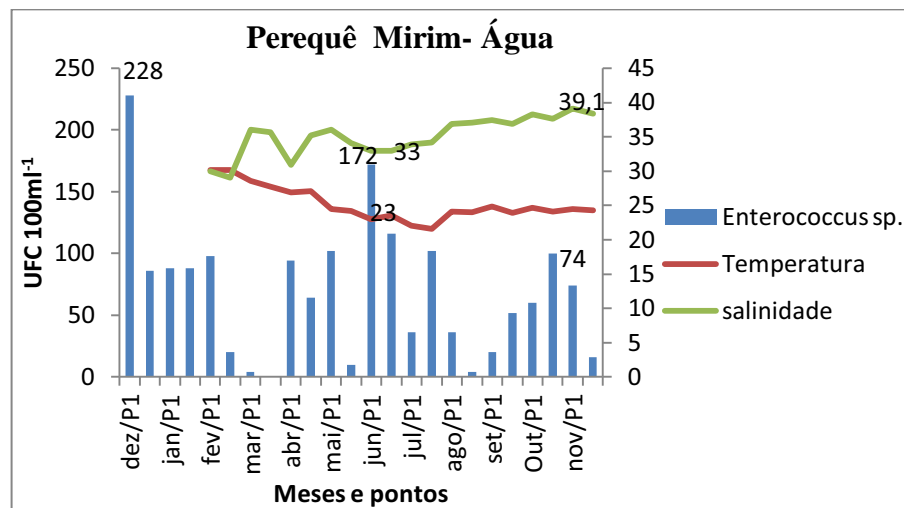


Fig.45. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em água com a temperatura e salinidade

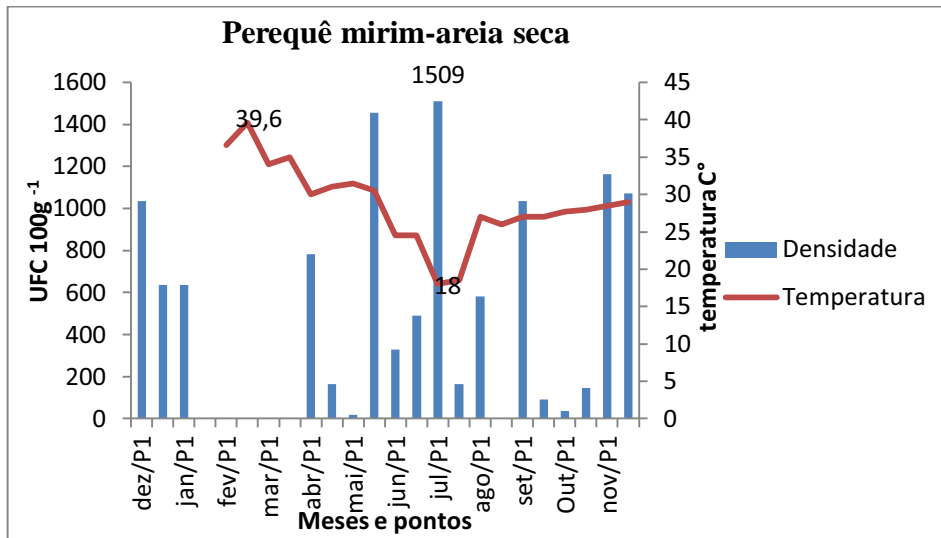


Fig.46. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em areia seca com a temperatura

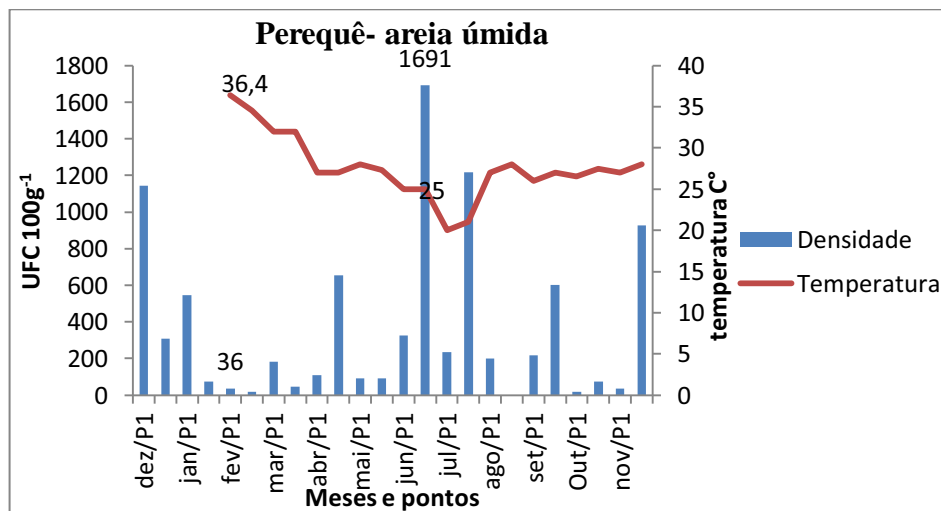


Fig.47. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em areia úmida com a temperatura

As densidades de *Enterococcus* sp em águas e areias (seca e úmida) de Perequê Mirim não apresentaram relação significativa com os volumes de precipitação (Figura 48).

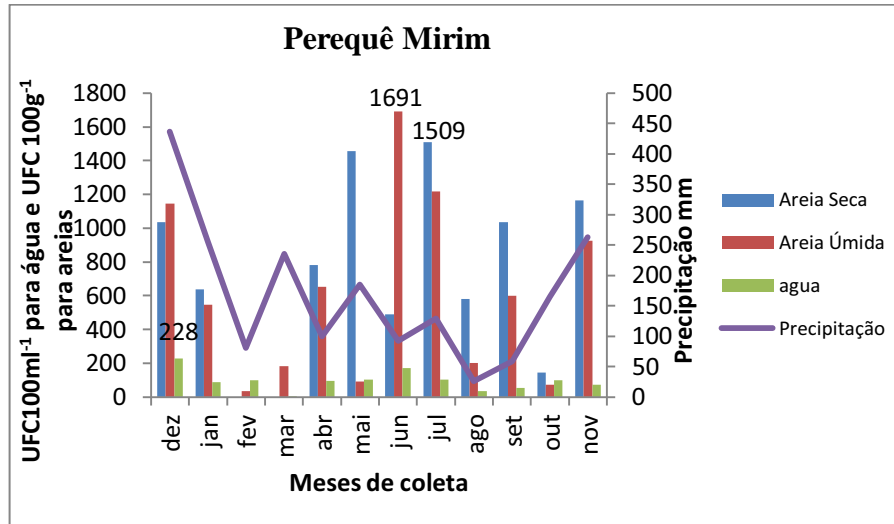


Fig.48. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em água e areias com a precipitação

Os dados de densidade de *Enterococcus* sp relativos ao Sargassum do P1 apresentaram relação negativa com a precipitação, onde a maior densidade foi em junho ($2,545 \times 10^3$ UFC100g⁻¹) com média de precipitação mensal de 92 mm. As densidades de *Sargassum* sp do P2 não apresentaram relação significativa com os volumes de precipitação, sendo que o pico foi nos mês de dezembro de $4,800 \times 10^3$ UFC100g⁻¹ com um volume de precipitação de 436,7 mm (Figura 49).

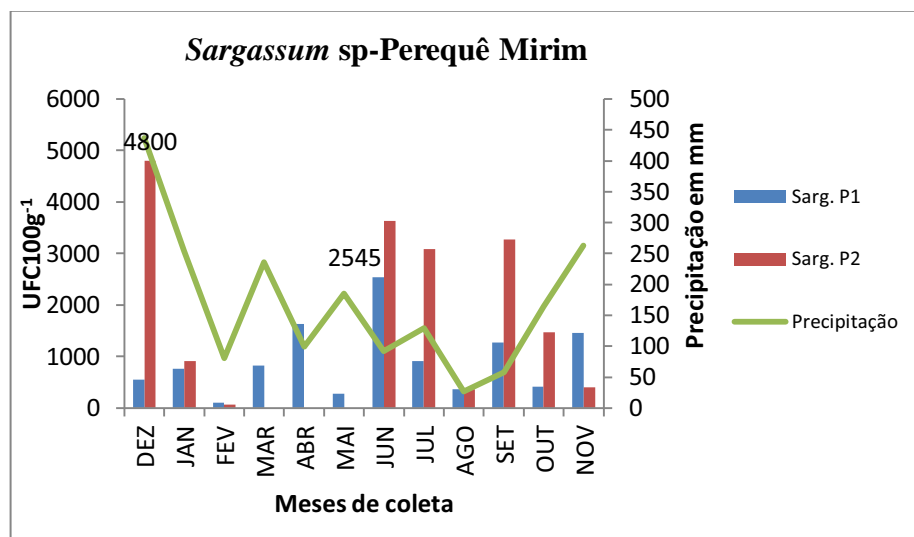


Fig.49. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em *Sargassum* sp com a precipitação

Na praia da Enseada, observou-se que as densidades de *Enterococcus* sp em água apresentaram relação negativa com a salinidade, com maior densidade em julho de 218 UFC100ml⁻¹ para uma salinidade de 37,2%. As densidades também apresentaram relação negativa com a temperatura da água, sendo que neste mês de julho de maior densidade a temperatura foi de 21,3°C (Figura 50). Para a areia seca não houve relação significativa das densidades de *Enterococcus* sp com a temperatura (Figura 51). Já a areia úmida apresentou uma relação negativa com maior densidade em junho (945 UFC100g⁻¹) com temperatura de 25°C (Figura 52).

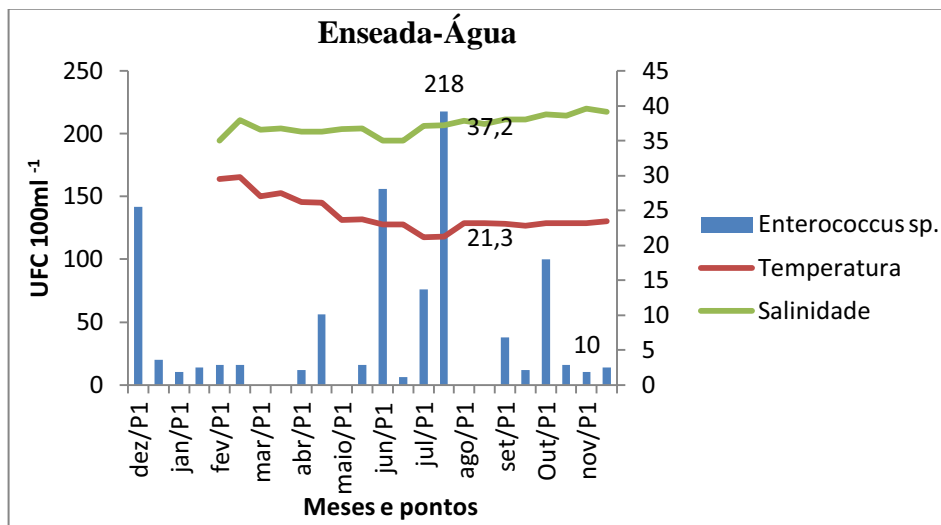


Fig.50. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em água com a temperatura e salinidade

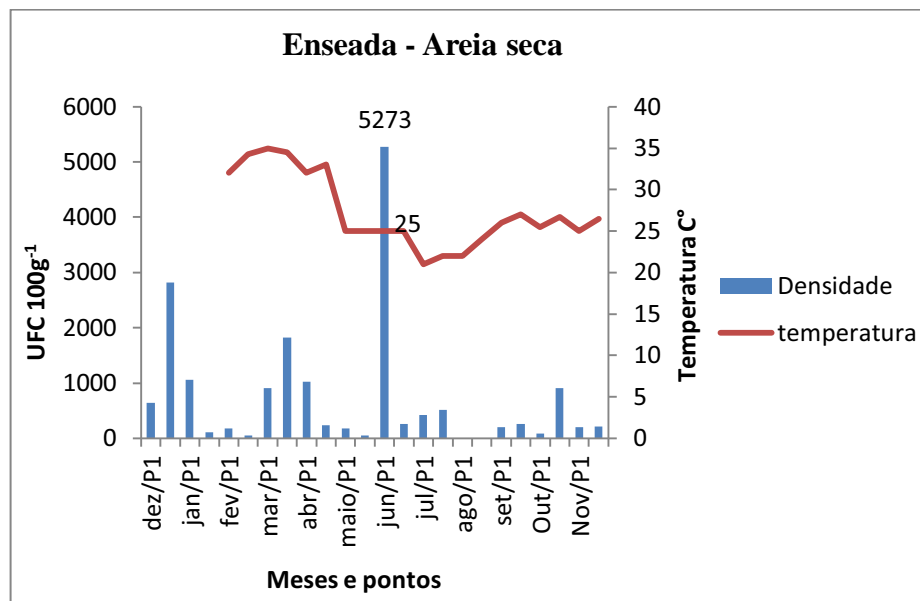


Fig.51. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em areia seca com a temperatura

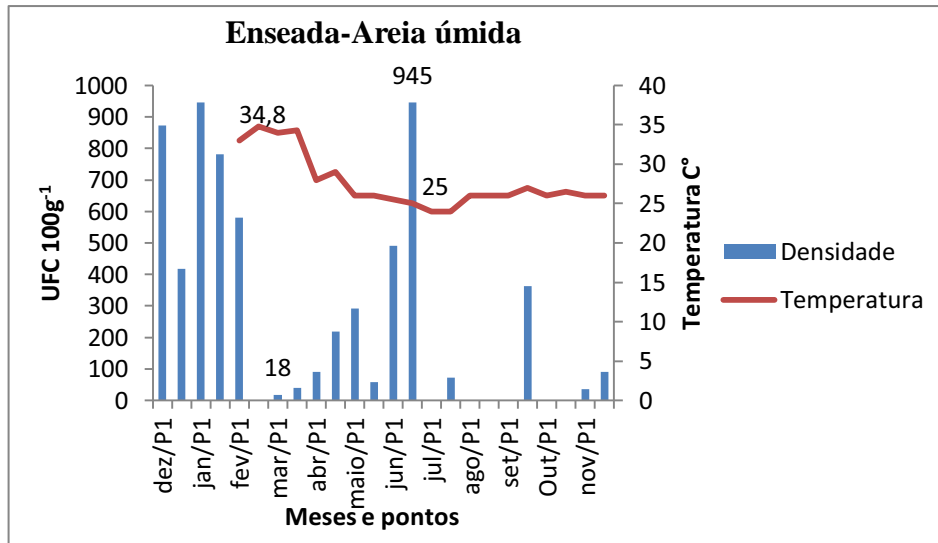


Fig.52. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em areia úmida com a temperatura

As densidade de *Enterococcus* sp em água e areias (seca e úmida) não apresentaram relação significativa com os volumes de precipitação (Figura 53). Já as densidades de *Sargassum* sp apresentaram relação negativa com os volumes de precipitação, com maior densidade em julho ($3,636 \times 10^3$ UFC100g⁻¹) com média mensal de precipitação de 129,3 mm (Figura 54).

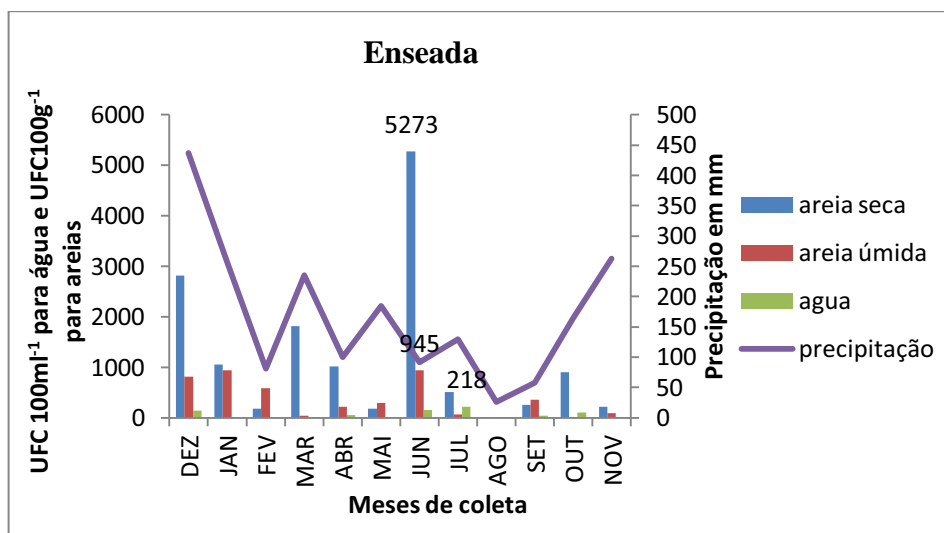


Fig.53. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em água e areias com a precipitação

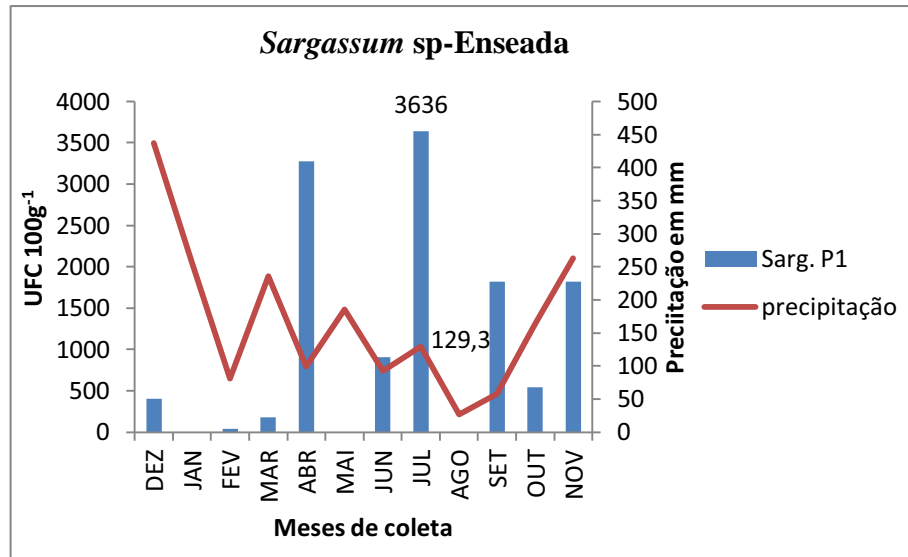


Fig.54. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em *Sargassum* sp com a precipitação

Na praia da Fortaleza, as densidades de *Enterococcus* sp em água apresentaram relação negativa com a salinidade, com maior densidade em abril (200 UFC100ml⁻¹) com salinidade de 36,1‰. A relação com a temperatura também foi negativa, com a maior densidade em temperatura de 27,5°C (Figura 55). Para as areias a relação de densidades com a temperatura foi negativa, onde a areia seca obteve maior densidade em junho (982 UFC100g⁻¹) com temperatura de 22°C (Figura 56). A areia úmida também apresentou maior densidade em junho (2,109X10³UFC) para a temperatura de 23°C (Figura 57).

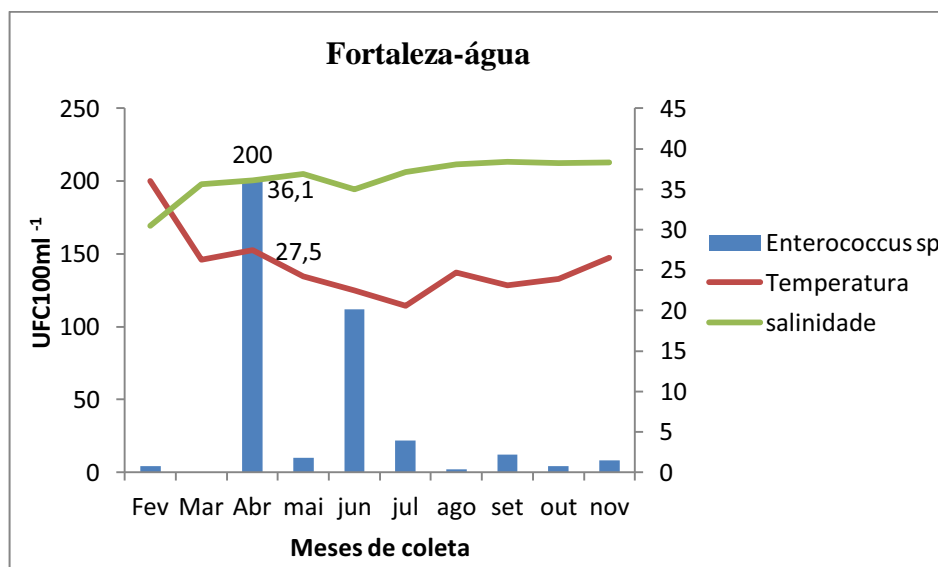


Fig.55. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em águas com a temperatura e salinidade

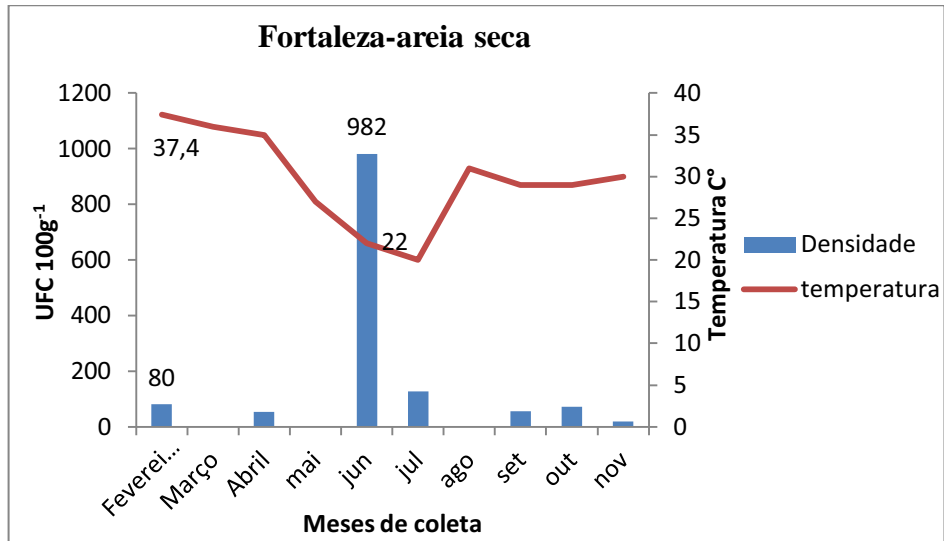


Fig.56. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em areia seca com a temperatura

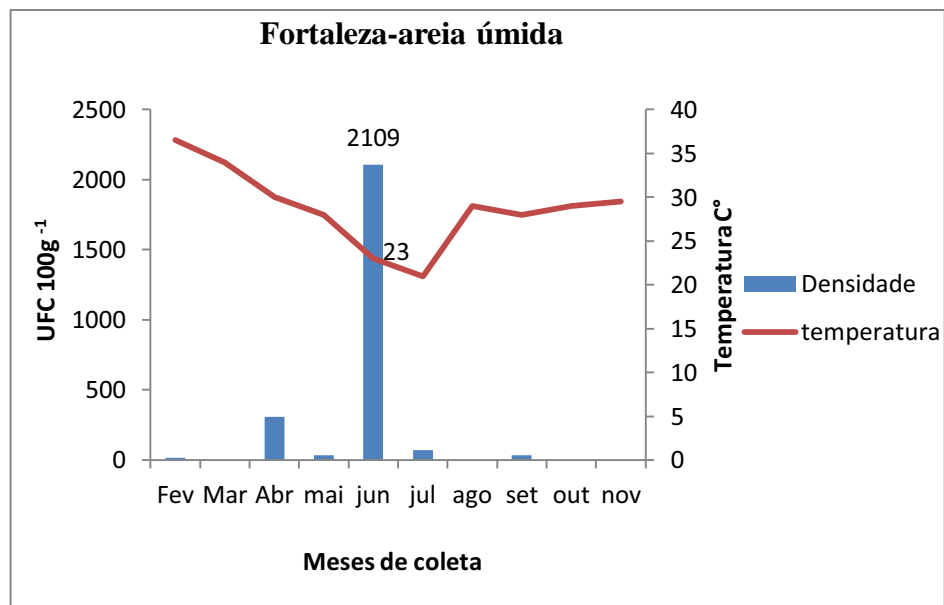


Fig.57. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em areia úmida com a temperatura

A comparação das densidades de *Enterococcus* sp da praia de Fortaleza com os volumes de precipitação foi significativa e negativa, tanto para água quanto para areias (seca e úmida), com as maiores densidades em junho para areias ($982 \text{ UFC}_{100\text{g}^{-1}}$ areia seca e $2,109 \times 10^3 \text{ UFC}_{100\text{g}^{-1}}$ areia úmida) com volume médio de 92 mm de precipitação e em abril para água ($200 \text{ UFC}_{100\text{ml}^{-1}}$) com volume médio de precipitação de 99,6 mm (Figura 58). Para o *Sargassum* sp a relação de densidades de *Enterococcus* sp com a precipitação não foi significativa (Figura 59).

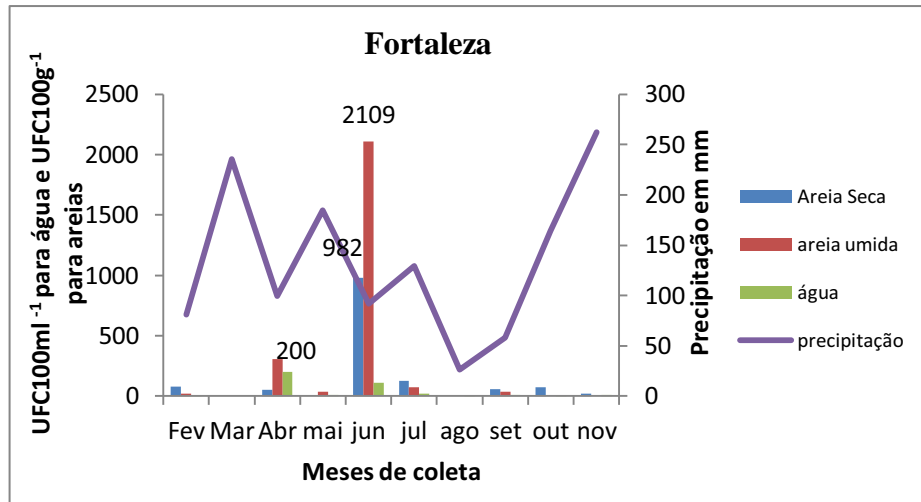


Fig.58. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em água e areias com a precipitação

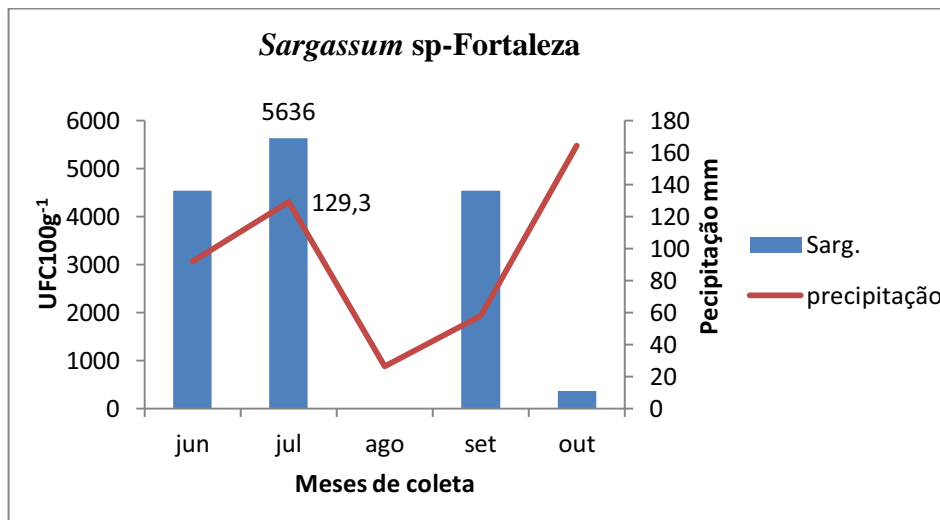


Fig.59. Variação da densidade de *Enterococcus* sp em *Sargassum* sp com a precipitação

4.9. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli*

4.9.1. Verão-outono-Água

Na praia do Perequê Mirim, 100% das cepas de *E.coli* testadas apresentaram resistência aos antibióticos amoxicilina + ácido Clavulânico, ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina e vancomicina; 80% a ampicilina e rifampicina e 60% a estreptomicina e gentamicina. Na praia da Enseada 80% das cepas apresentaram resistência amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, rifampicina e vancomicina; 60% de cepas foram

resistentes à tetraciclina, 40% gentamicina e todas as cepas foram sensíveis à estreptomicina (0% de resistência). Na praia da Fortaleza 100% das cepas foram resistentes a eritromicina, rifampicina e a vancomicina, 50% foram resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina e tetraciclina e todas as cepas foram sensíveis a estreptomicina (Figura 60).

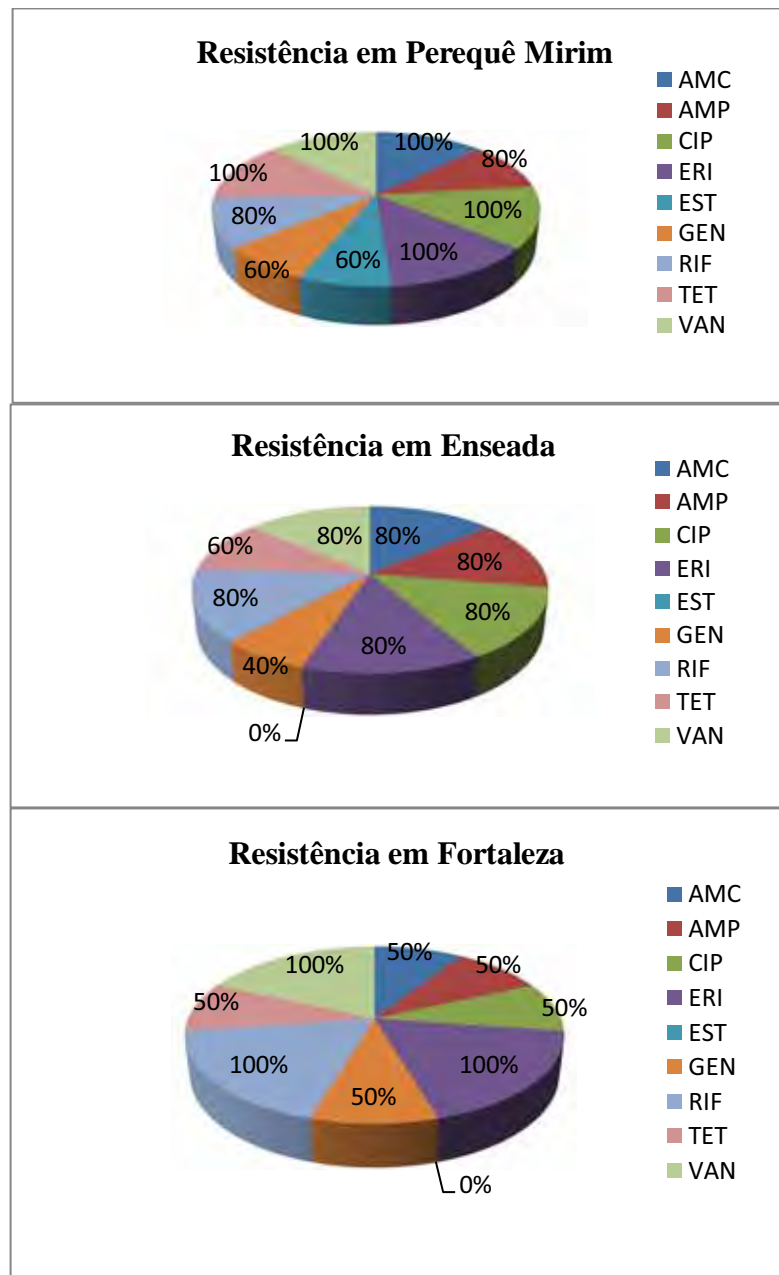


Fig.60. Resistência de *Escherichia coli* em água

4.9.2. Verão-outono- areia seca

Nas amostras de areia seca da praia do Perequê Mirim, 100% das cepas de *Escherichia coli* testadas foram resistentes a quase todos os antibióticos à exceção de gentamicina. Na praia da Enseada 100% das cepas foram resistentes a ciprofloxacina, 50% das cepas foram resistentes a eritromicina, gentamicina e vancomicina e quantos aos demais antibióticos (amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, estreptomicina, rifampicina e tetraciclina) todas as cepas testadas foram sensíveis. Na praia de Fortaleza, 100% das cepas de *Escherichia coli* testadas foram resistentes a todos os antibióticos (Figura 61).

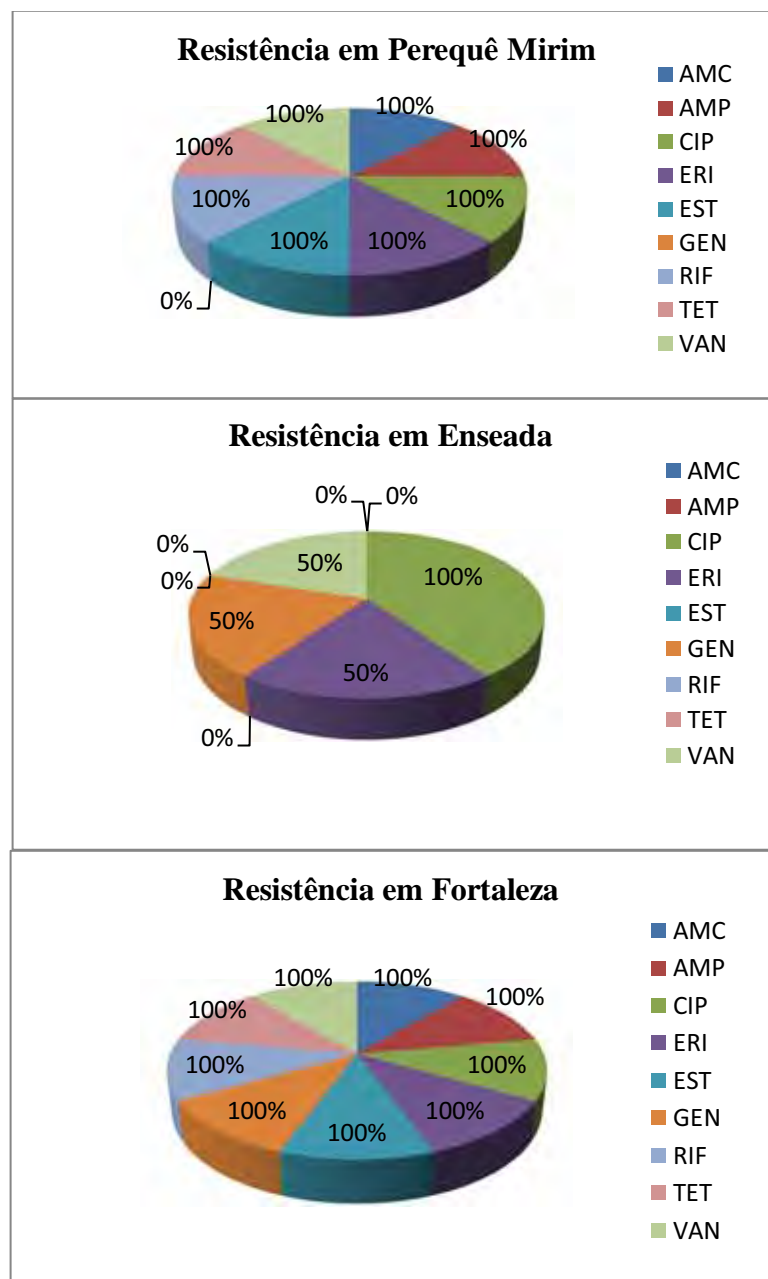


Fig.61. Resistência de *Escherichia coli* em areia seca

4.9.3. Verão-outono- areia úmida

Para as amostras de areia úmida, verificou-se na praia do Perequê Mirim que 100% das cepas de *E.coli* foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina e vancomicina; 75% de cepas resistentes a ampicilina, ciprofloxacina e gentamicina e 50% de cepas resistentes à estreptomicina, rifampicina e tetraciclina. Na praia da Enseada, 100% de cepas de *E.coli* foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, estreptomicina, gentamicina e vancomicina e 50% foram resistentes a rifampicina e a tetraciclina. Na praia da Fortaleza 100% das cepas testadas foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, eritromicina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina e todas foram sensíveis aos antibióticos ciprofloxacina, estreptomicina e gentamicina (Figura 62).

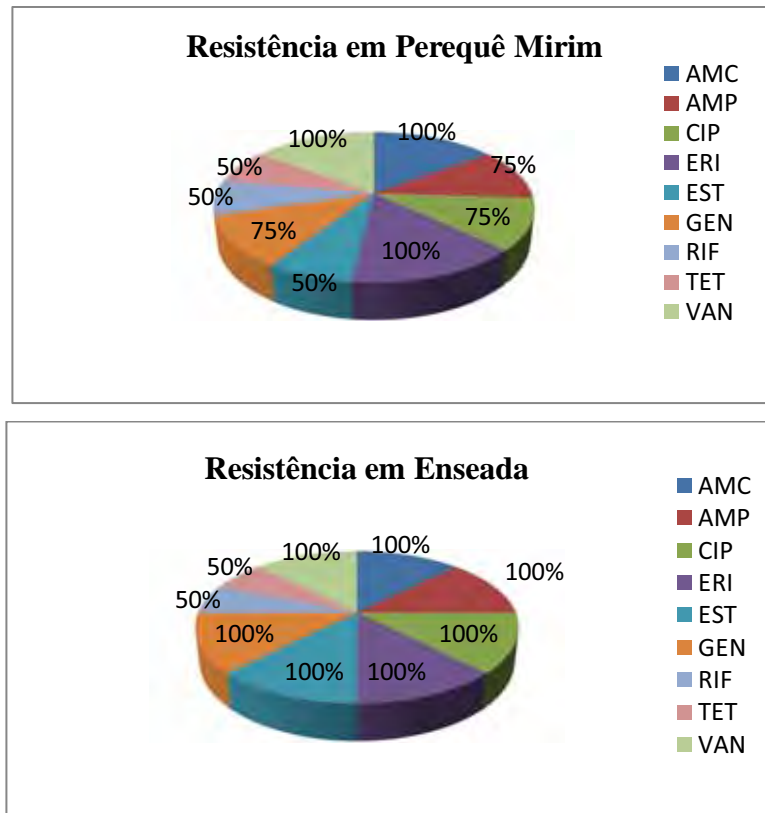




Fig.62. Resistência de *Escherichia coli* em areia úmida

4.9.4. Verão-outono- *Sargassum* sp

Nas amostras de *Sargassum* sp da praia Pereque Mirim, 100% das cepas de *Escherichia coli* testadas foram resistentes a quase todos os antibióticos, com exceção a rifampicina e tetraciclina que 50% das cepas apresentaram resistência e 50% foram sensíveis. Na praia da Enseada 100% das cepas testadas foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, gentamicina e vancomicina; 50% de cepas resistentes a ciprofloxacina, eritromicina e rifampicina e todas as cepas foram sensíveis à tetraciclina e estreptomicina (0% de resistência) (Figura 63).

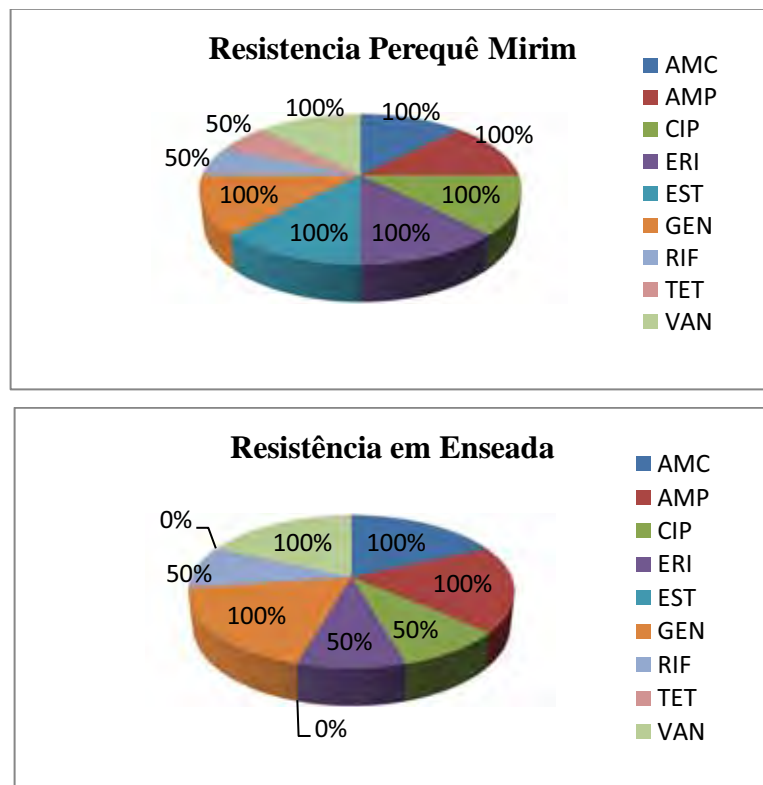


Fig.63. Resistência de *Escherichia coli* em *Sargassum* sp

Não houve coleta de *Sargassum* sp para a praia da Fortaleza nos meses de início das coletas, portanto não foram feitos os testes de resistência para esta praia neste período.

4.9.5. Outono-inverno-Água

Das cepas testadas na amostra de água da praia do Perequê Mirim, 100% foram resistentes aos antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina e vancomicina; 75% foram resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, estreptomicina e gentamicina e 0% de cepas resistentes a rifampicina, ou seja, todas as cepas foram sensíveis a este antibiótico. Na praia da enseada 100% das cepas de amostras de água testadas foram resistentes aos antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina e estreptomicina; 67% de cepas resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico; 50% de cepas resistentes à gentamicina e todas sensíveis (0% de cepas resistentes) a rifampicina. Na praia da Fortaleza 100% das cepas testadas foram resistentes a todos os antibióticos testados (Figura 64).

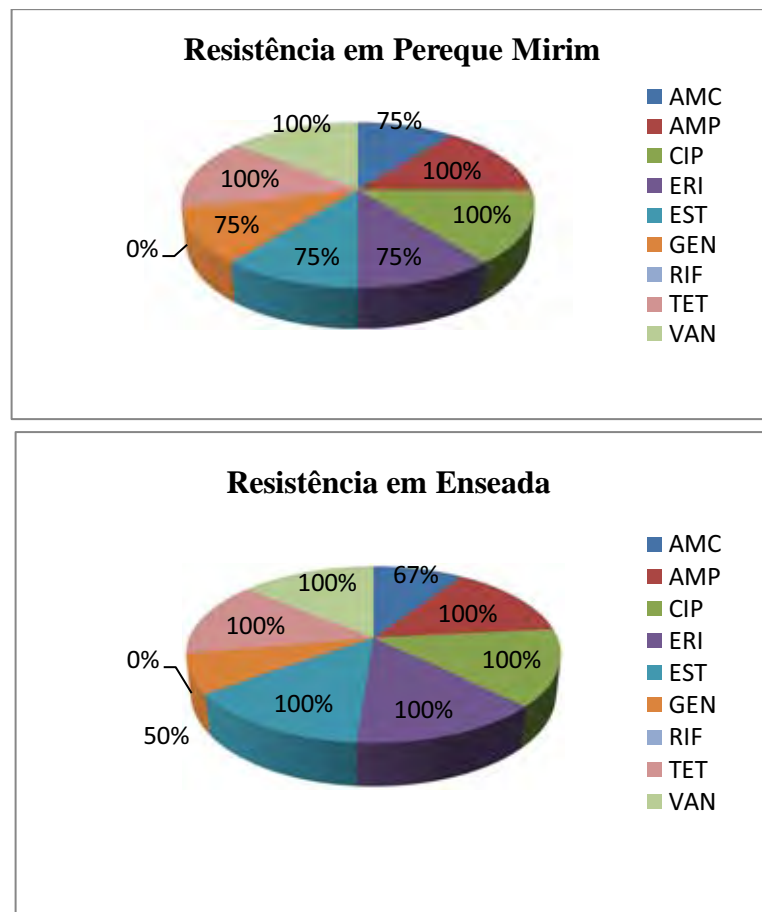




Fig.64. Resistência de *Escherichia coli* em água

4.9.6. Outono-inverno-Areia seca

Na praia do Perequê Mirim, 100% das cepas testadas de *Escherichia coli* foram resistentes a quase todos os antibióticos com exceção do antibiótico rifampicina o qual todas as cepas foram sensíveis. Na Enseada, 100% das cepas foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, gentamicina e vancomicina; 80% de cepas resistentes a ciprofloxacina, eritromicina, estreptomicina e tetraciclina e 0% de cepas resistentes a rifampicina, todas foram sensíveis a este antibiótico. Na praia da fortaleza 100% das cepas de *E.coli* foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, eritromicina, gentamicina, rifampicina e vancomicina; 50% de cepas resistentes a ciprofloxacina e tetraciclina e todas as cepas foram sensíveis ao antibiótico estreptomicina (0% de cepas resistentes) (Figura 65).

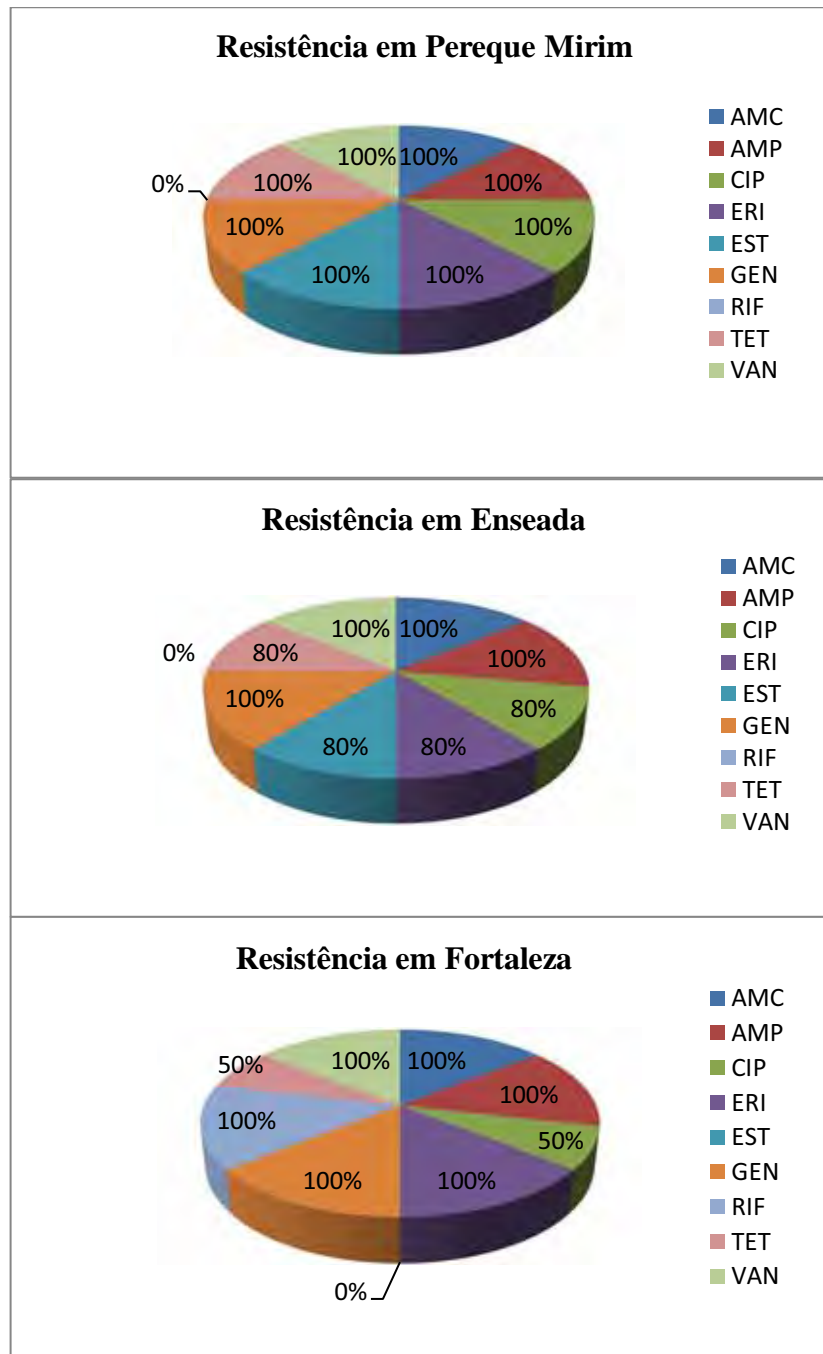


Fig.65. Resistência de *Escherichia coli* em areia seca

4.9.7. Outono-inverno-Areia úmida

Analisando as cepas da praia do Perequê Mirim, 100% destas foram resistentes aos antibióticos ampicilina, eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e vancomicina; 67% de cepas resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico e gentamicina, 33% de cepas resistentes à

estreptomicina e todas as cepas sensíveis ao antibiótico rifampicina. Na Enseada 100% das cepas foram resistentes aos antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina e vancomicina; 75% das cepas foram resistentes à gentamicina e tetraciclina; 50% de cepas resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico e estreptomicina e 33% de cepas resistentes a rifampicina. Em fortaleza, 100% das cepas de *E.coli* foram resistentes a quase todos os antibióticos testados com exceção de rifampicina, o qual todas as cepas foram sensíveis (Figura 66).

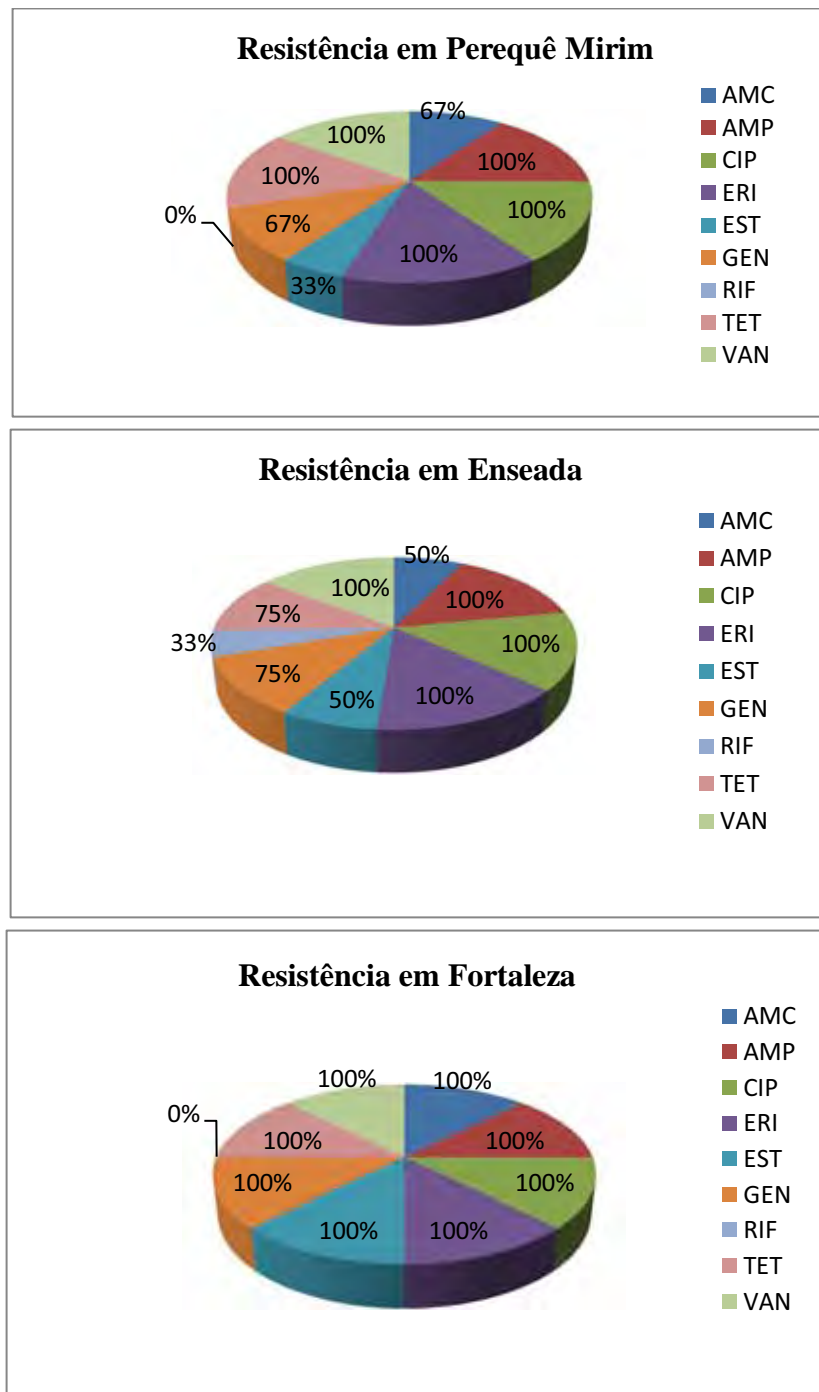


Fig.66. Resistência de *Escherichia coli* em areia úmida

4.9.8. Outono-inverno-*Sargassum* sp

Das cepas de *Escherichia coli* da praia de Perequê Mirim, 100% foram resistentes aos antibióticos ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, rifampicina e vancomicina e todas as cepas foram sensíveis aos demais antibióticos (amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, estreptomicina e tetraciclina). Para a praia da Enseada 100% cepas testadas foram resistentes a quase todos os antibióticos com exceção de estreptomicina e rifampicina aos quais todas as cepas testadas foram sensíveis. Para a praia de Fortaleza, não foram encontradas densidades de *E.coli* durante estes meses (Figura 67).

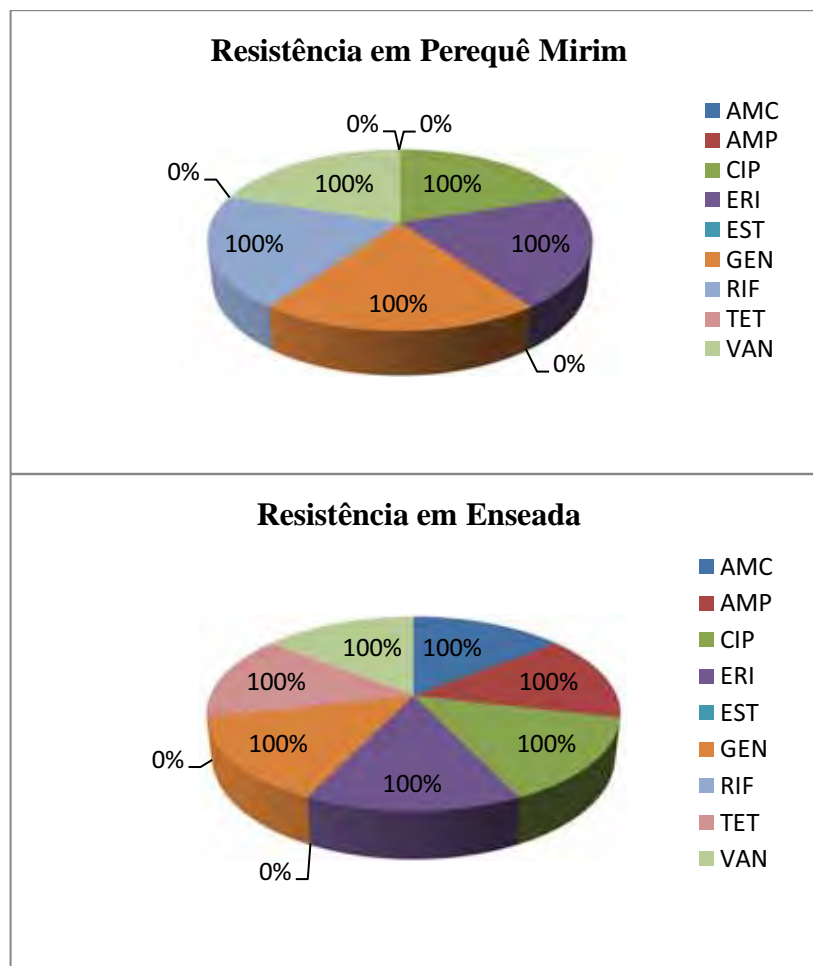
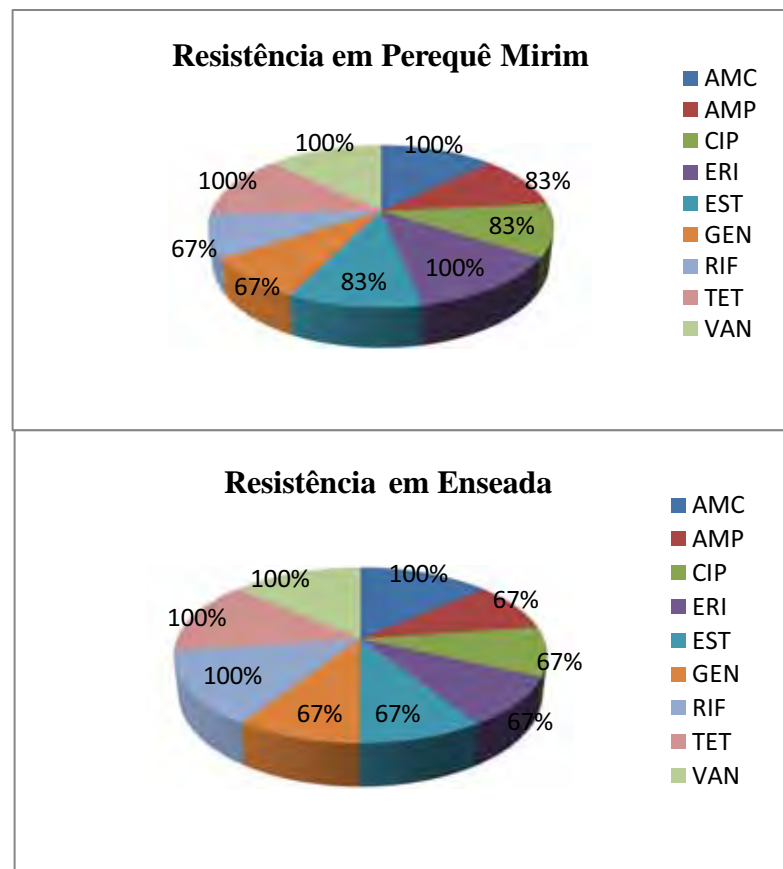


Fig.67. Resistência de *Escherichia coli* em *Sargassum* sp

4.9.9. Primavera-verão-água

Das cepas de *Escherichia coli* de Perequê Mirim 100% foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, tetraciclina e vancomicina; 83% de cepas resistentes a ampicilina, ciprofloxacina e estreptomicina e 67% de cepas resistentes a gentamicina e rifampicina. Na praia da Enseada 100% de cepas foram resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, rifampicina, tetraciclina e vancomicina e 67% das cepas foram resistentes a ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, estreptomicina e gentamicina. Em Fortaleza 100% das cepas de *E. coli* foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina e vancomicina, e todas as cepas foram sensíveis aos antibióticos rifampicina e estreptomicina (0% de cepas resistentes) (Figura 68).



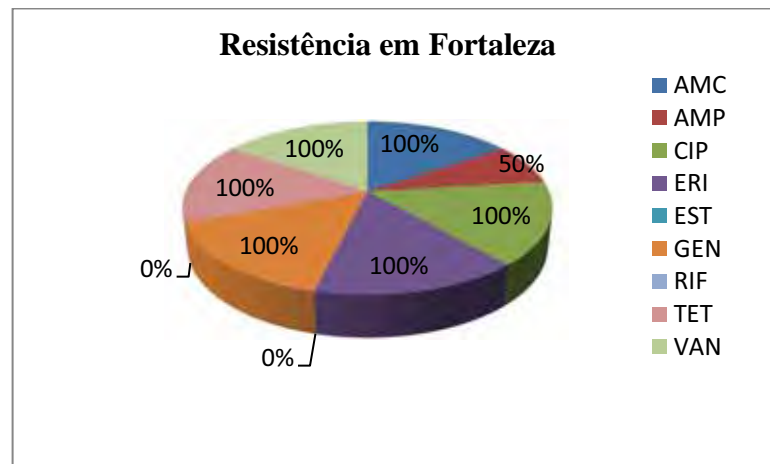


Fig.68. Resistência de *Escherichia coli* em água

4.9.10. Primavera-verão-Areia seca

Na praia de Perequê Mirim 67% das cepas foram resistentes à estreptomicina e 100% das cepas a quase foram resistentes aos demais antibióticos testados. Das cepas de *E.coli* da Enseada 100% foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, rifampicina e vancomicina; 83% a gentamicina e 67% a estreptomicina e tetraciclina. Na praia de Fortaleza 100% das cepas testadas foram resistentes a antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, e vancomicina; 67% de cepas resistentes à tetraciclina; 33% de cepas resistentes a gentamicina e rifampicina e 0% de cepas resistentes a estreptomicina, todas foram sensíveis a este antibiótico (Figura 69).

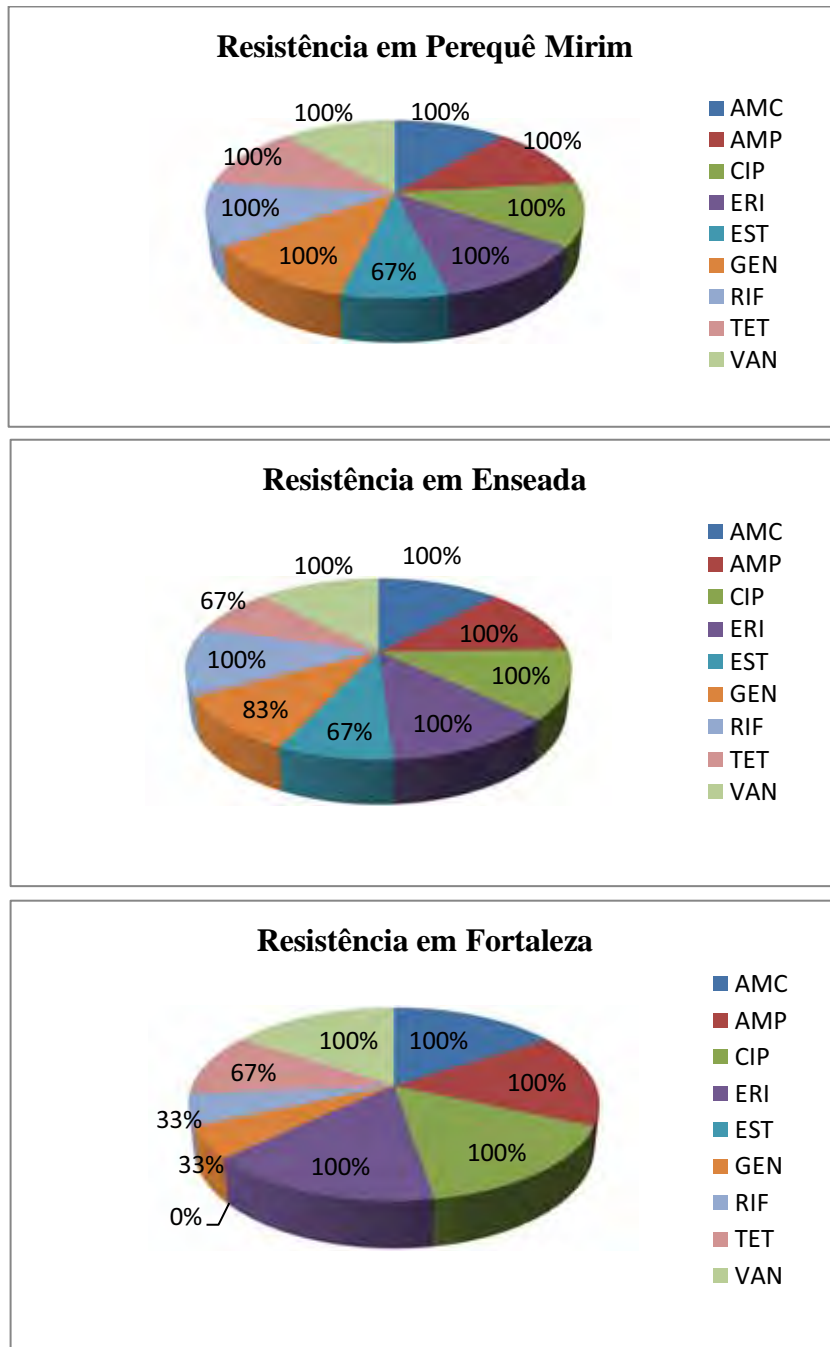


Fig.69. Resistência de *Escherichia coli* em areia seca

4.9.11. Primavera-verão-Areia úmida

Os testes com as cepas de *Escherichia coli* de Perequê Mirim mostraram que 100% destas foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, rifampicina e vancomicina; 75% de cepas resistentes à tetraciclina e 25% de cepas resistentes a gentamicina e estreptomicina. Já a praia da Enseada apresentou 100% de cepas resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, eritromicina, rifampicina e vancomicina; 80% de resistência a ciprofloxacina e tetraciclina e 60% de cepas resistentes à estreptomicina e gentamicina. E em Fortaleza 100% das cepas de *E.coli* foram resistentes a todos os antibióticos testados (Figura 70).

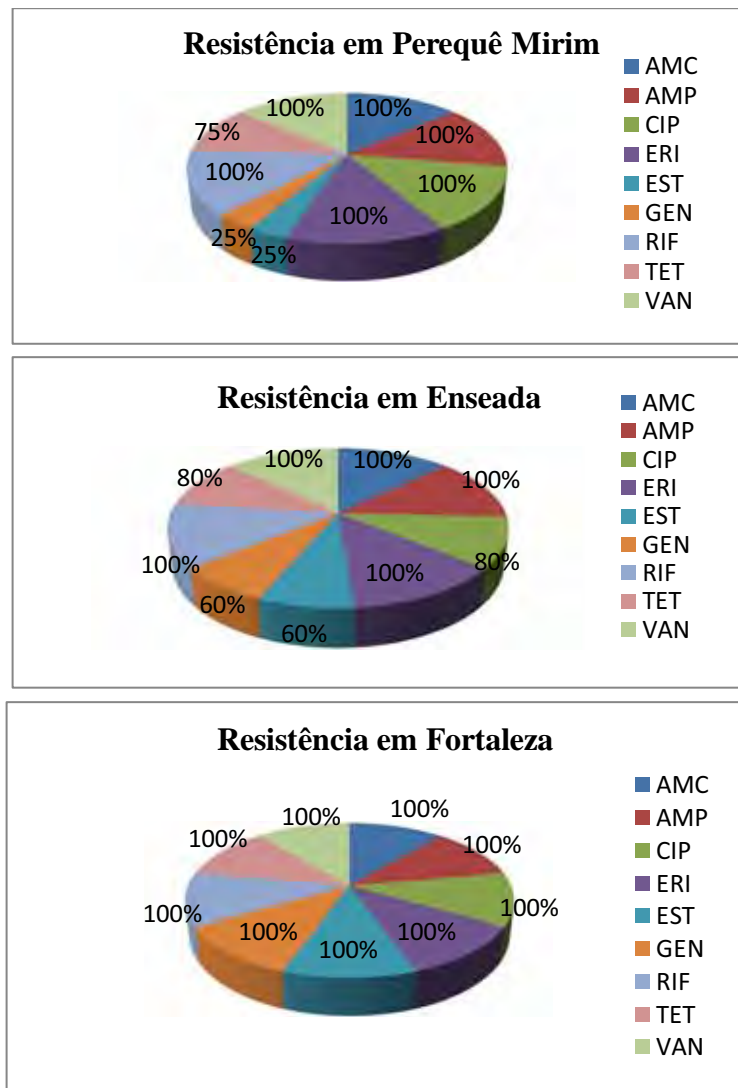


Fig.70. Resistência de *Escherichia coli* em areia úmida

4.9.12. Primavera-verão-*Sargassum* sp

Das cepas de *E.coli* isoladas do *Sargassum* em Perequê Mirim 72% foram resistentes a rifampicina; 43% resistentes à gentamicina; 28% das cepas foram resistentes à estreptomicina e 100% das cepas de *E.coli* foram resistentes aos demais antibióticos. Na praia da Enseada, 100% foram resistentes à tetraciclina e vancomicina; 75% de cepas resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, eritromicina e rifampicina, 25% resistentes a ciprofloxacina e todas as cepas foram sensíveis à estreptomicina e a gentamicina, ou seja, 0% de cepas resistentes a estes dois antibióticos. Em Fortaleza 67% das cepas testadas foram resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, 0% de cepas resistentes a gentamicina, todas foram sensíveis a este antibiótico e 100% das cepas foram resistentes aos demais antibióticos (Figura 71).

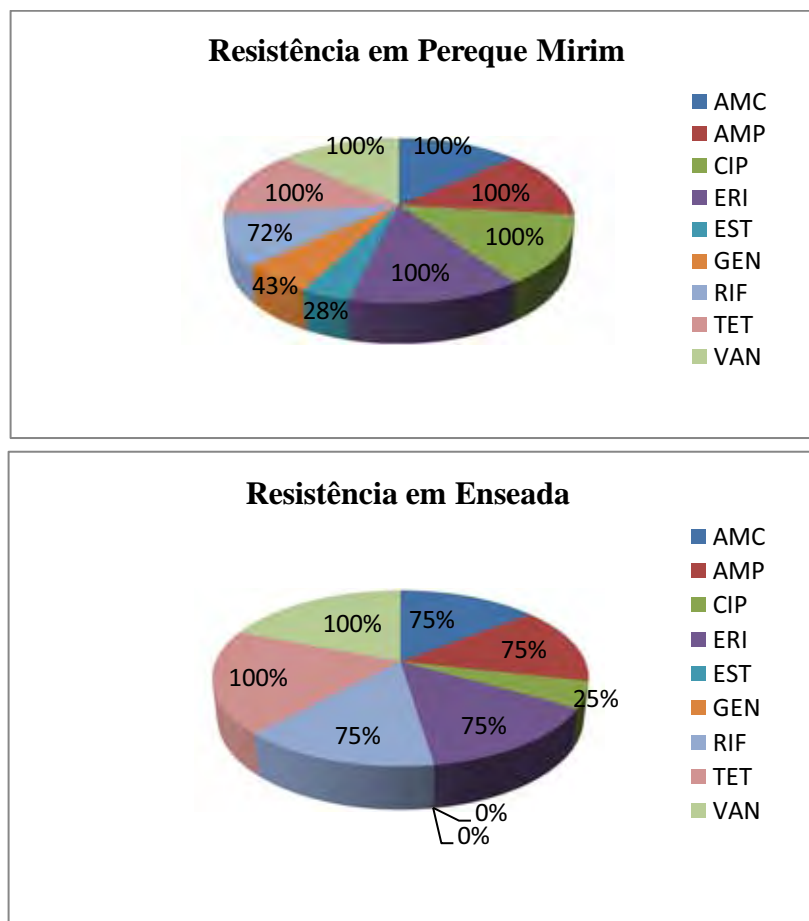




Fig.71. Resistência de *Escherichia coli* em *Sargassum* sp

4.10. Resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* sp

4.10.1. Verão-outono-Água

Na praia de Perequê Mirim 100% das cepas de *Enterococcus* sp testadas foram resistentes a estreptomicina, gentamicina e tetraciclina; 50% de cepas de *Enterococcus* sp resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, eritromicina, rifampicina e vancomicina e todas as cepas foram sensíveis a ciprofloxacina (0% resistentes). Na praia da Enseada 34% de cepas de *Enterococcus* sp foram resistentes a tetraciclina, 0% de resistentes a ciprofloxacina, ou seja, todas as cepas foram sensíveis a este antibiótico e 66% de cepas resistentes aos demais antibióticos. Em Fortaleza 100% das cepas de *Enterococcus* sp foram resistentes a quase todos os antibióticos testados com exceção de ciprofloxacina o qual todas as cepas testadas foram sensíveis (Figura 72).

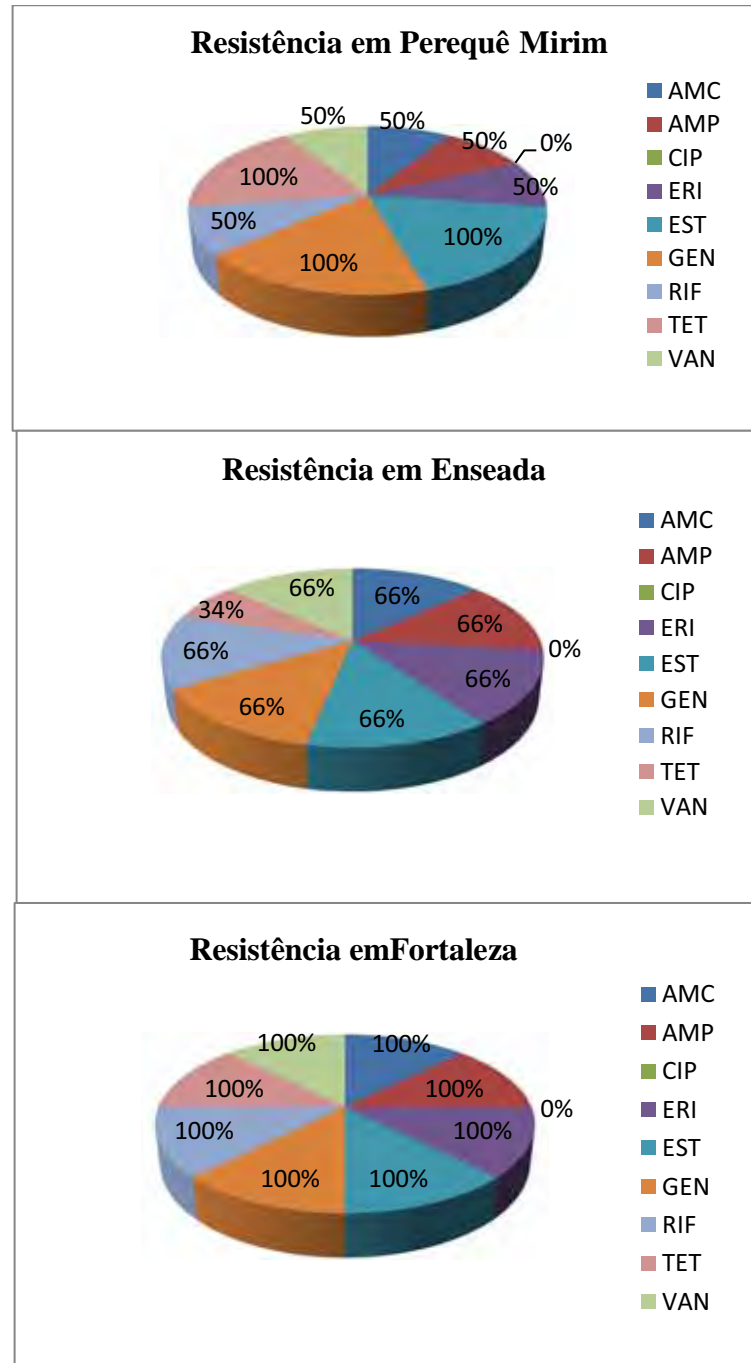


Fig.72. Resistência de *Enterococcus* sp em água

4.10.2. Verão-outono-Areia seca

Em Perequê Mirim das cepas de *Enterococcus* sp testadas, 100% apresentaram resistência a quase todos os antibióticos com exceção de ciprofloxacina, as quais toda as cepas foram sensíveis (0% resistentes). Na praia da Enseada 60% das cepas foram resistentes aos antibióticos eritromicina, gentamicina e rifampicina; 40% resistentes à estreptomicina,

tetraciclina e vancomicina; 20% de cepas resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico e ampicilina e todas as cepas foram sensíveis a ciprofloxacina. Já na praia da fortaleza, 50% das cepas foram resistentes a quase todos os antibióticos, com exceção de ciprofloxacina, o qual todas as cepas de *Enterococcus* testadas foram sensíveis (Figura 73).

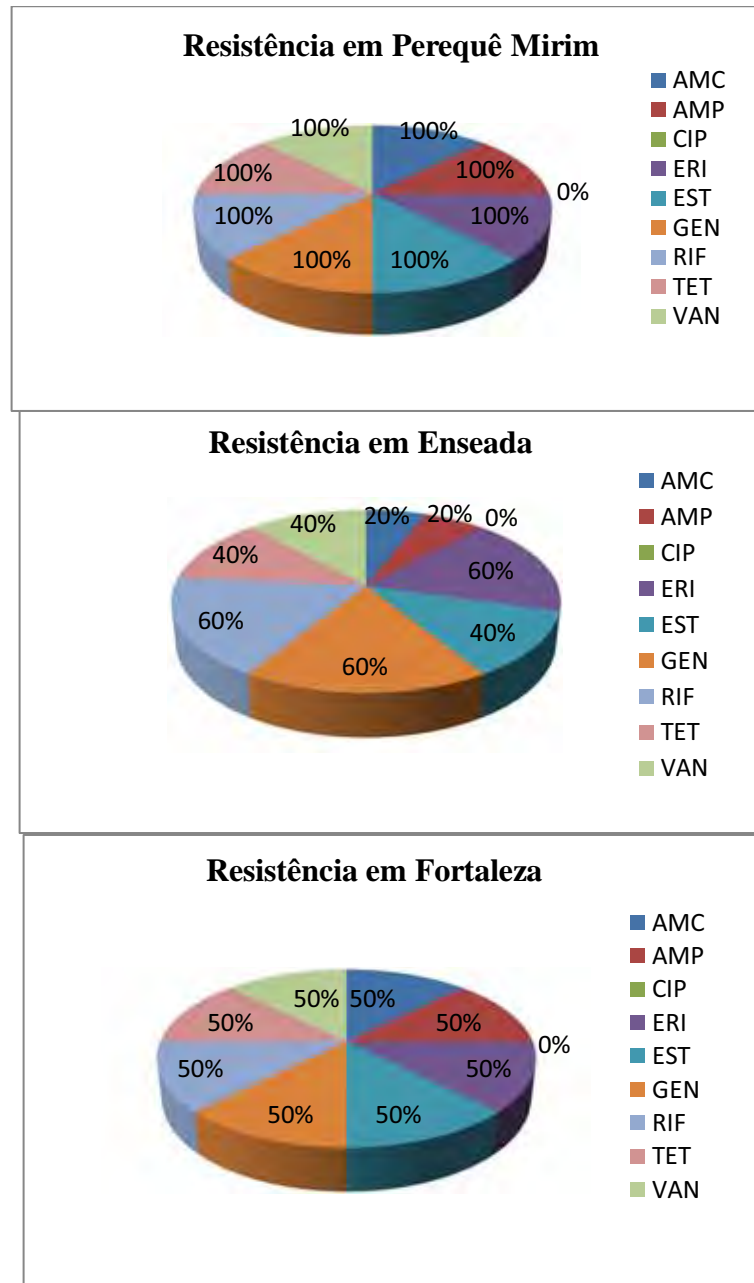


Fig.73. Resistência de *Enterococcus* sp em areia seca

4.10.3. Verão-outono-Areia úmida

Para a praia de Perequê Mirim, 50% das cepas de *Enterococcus* sp testadas apresentaram resistência a gentamicina, 0% de cepas resistentes a ciprofloxacina, todas sensíveis as este antibiótico e 100% de cepas resistentes aos demais antibióticos. Na praia da Enseada, 100% das cepas foram resistentes a eritromicina; 75% resistentes a rifampicina e a tetraciclina, 25% das cepas de *Enterococcus* sp resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina e vancomicina e todas as cepas foram sensíveis ao antibiótico ciprofloxacina (0% de resistência). Em Fortaleza as cepas apresentaram sensibilidade a ampicilina e ciprofloxacina com 0% das cepas resistentes a estes dois antibióticos e 50% das cepas foram resistentes aos demais antibióticos testados (Figura 74).

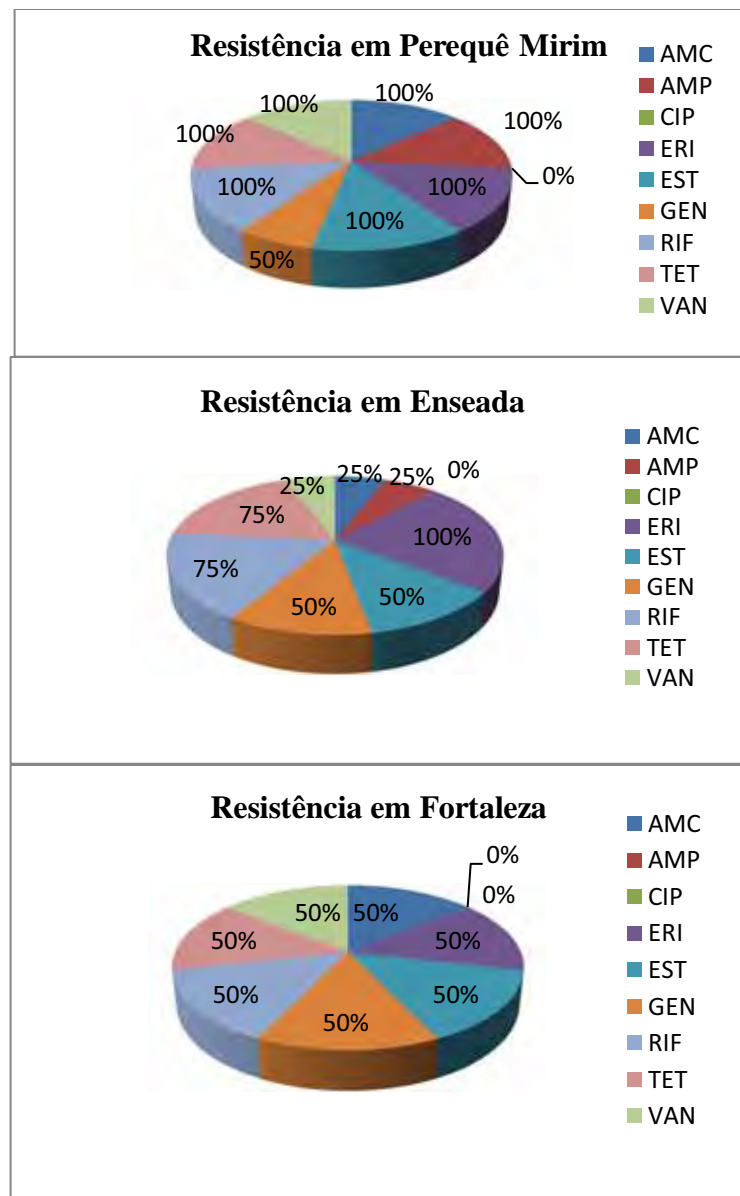


Fig.74. Resistência de *Enterococcus* sp em areia úmida

4.10.4. Verão-outono-*Sargassum* sp

Em Perequê Mirim 100% das cepas de *Enterococcus* sp apresentaram resistência ao antibiótico rifampicina; 60% das cepas foram resistentes a eritromicina, 40% a amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, estreptomicina, gentamicina e vancomicina e 20% das cepas foram resistentes a ciprofloxacina. Na praia da Enseada 100% das cepas de *Enterococcus* sp foram resistentes a quase todos os antibióticos testados com exceção de ciprofloxacina o qual todas as cepas foram sensíveis. Em Fortaleza não houve coleta de *Sargassum* nesta estação (Figura 75).

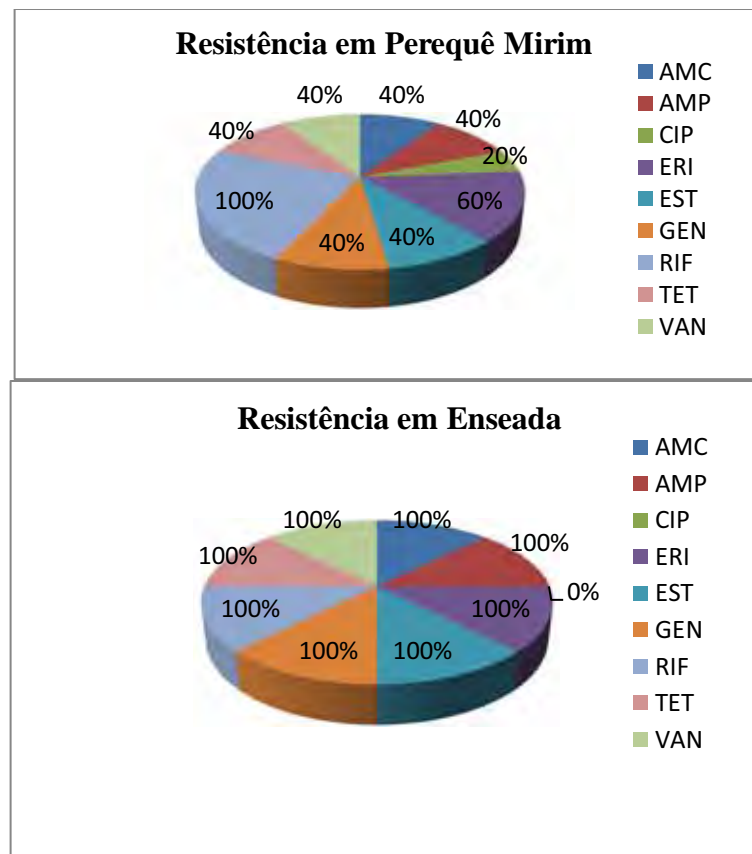


Fig.75. Resistência de *Enterococcus* sp em *Sargassum* sp

4.10.5. Outono-inverno-Água

Em Perequê Mirim as das cepas de *Enterococcus* sp testadas, 100% apresentaram resistência ao antibiótico rifampicina; 84% das cepas foram resistentes a eritromicina e a estreptomicina; 50% de cepas resistentes a eritromicina; 17% das cepas resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina e vancomicina e todas as cepas de *Enterococcus*

sp testadas foram sensíveis a ciprofloxacina. Na praia da Enseada 75% das cepas foram resistentes eritromicina, estreptomicina e tetraciclina; 50% das cepas foram resistentes a gentamicina; 34% resistentes a rifampicina e as cepas de *Enterococcus* apresentaram sensibilidade (0% resistentes) aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina e vancomicina. Na praia da Fortaleza, 100% das cepas foram resistentes a eritromicina; 67% resistentes à estreptomicina e tetraciclina; todas as cepas testadas apresentaram sensibilidade (0% de cepas de *Enterococcus* resistentes) aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina, rifampicina e vancomicina (Figura 76).

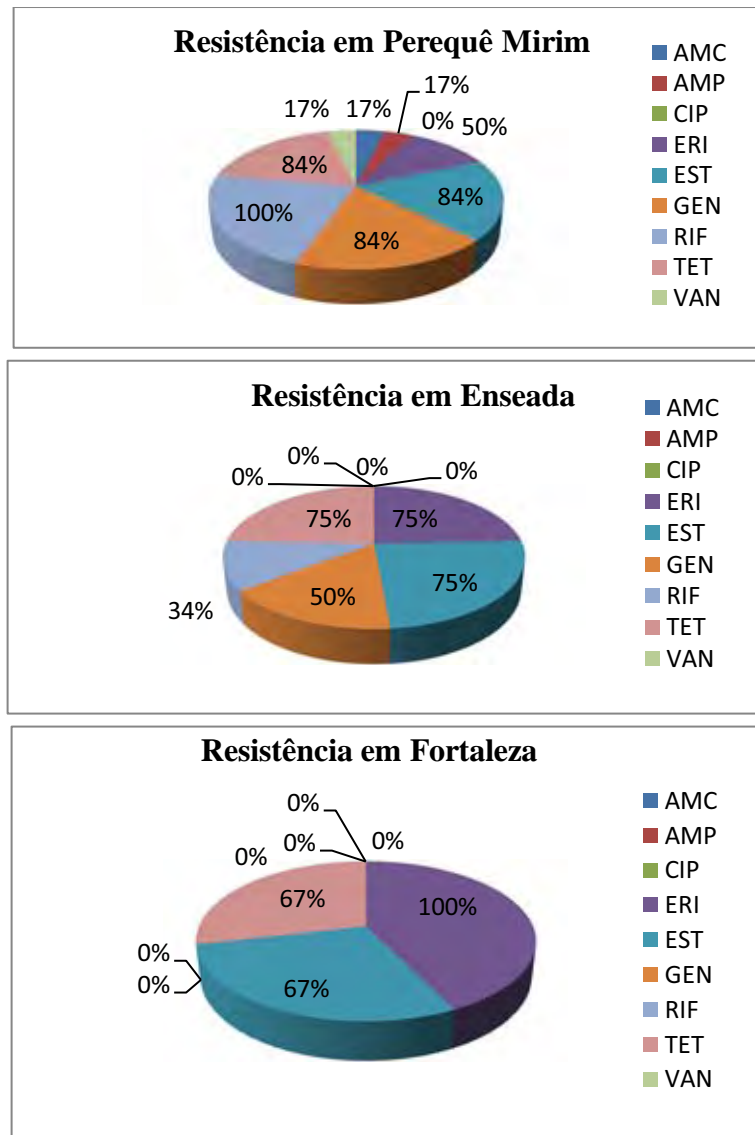


Fig.76. Resistência de *Enterococcus* sp em água

4.10.6. Outono-inverno-Areia seca

Na praia de pereque mirim, as cepas apresentaram 75% de resistência para os antibióticos eritromicina, rifampicina e tetraciclina; 50% de cepas resistentes à estreptomicina e a gentamicina; 25% de cepas resistentes a ampicilina e todas as cepas apresentaram sensibilidade (0% de cepas resistentes) aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ciprofloxacina e vancomicina. Em Enseada das cepas de *Enterococcus* sp 50% apresentaram resistência aos antibióticos eritromicina, estreptomicina, rifampicina e tetraciclina; 75% de cepas resistentes a gentamicina; 25% resistentes a ampicilina e todas as cepas com sensibilidade a amoxicilina + ácido clavulânico, ciprofloxacina e vancomicina. As cepas de Fortaleza apresentaram sensibilidade a quase todos os antibióticos com exceção do antibiótico eritromicina o qual 100% das cepas apresentaram resistência (Figura 77).

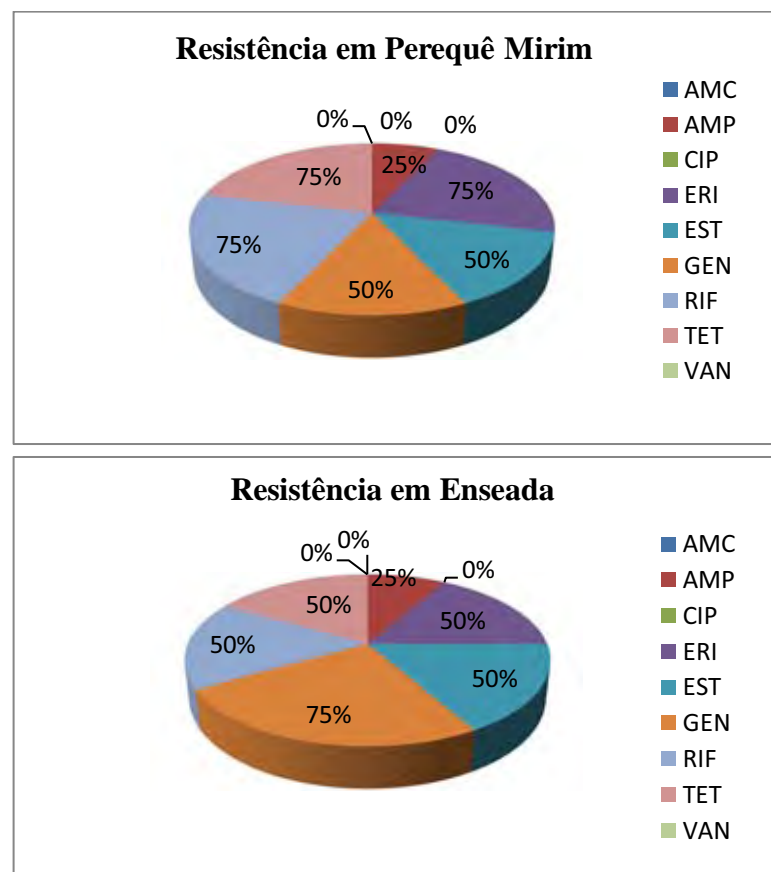


Fig.77. Resistência de *Enterococcus* sp em areia seca

4.10.7. Outono-inverno-Areia úmida

Em Perequê Mirim das cepas de *Enterococcus* sp testadas, 100% foram resistentes a tetraciclina; 67% destas cepas foram resistentes a estreptomicina e gentamicina; 60% resistentes a rifampicina; 50% resistentes a eritromicina e 17% das cepas foram resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina e vancomicina. Na Enseada 100% das cepas foram resistentes a eritromicina, tetraciclina e vancomicina; 80% de resistentes a estreptomicina e gentamicina; 50% resistentes a rifampicina; 40% de cepas resistentes a ampicilina e ciprofloxacina e 20% de cepas resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico. Em Fortaleza 100% das cepas foram resistentes ao antibiótico eritromicina; 34% das cepas foram resistentes à estreptomicina, gentamicina e tetraciclina e todas as cepas apresentaram sensibilidade aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina e vancomicina (Figura 78).

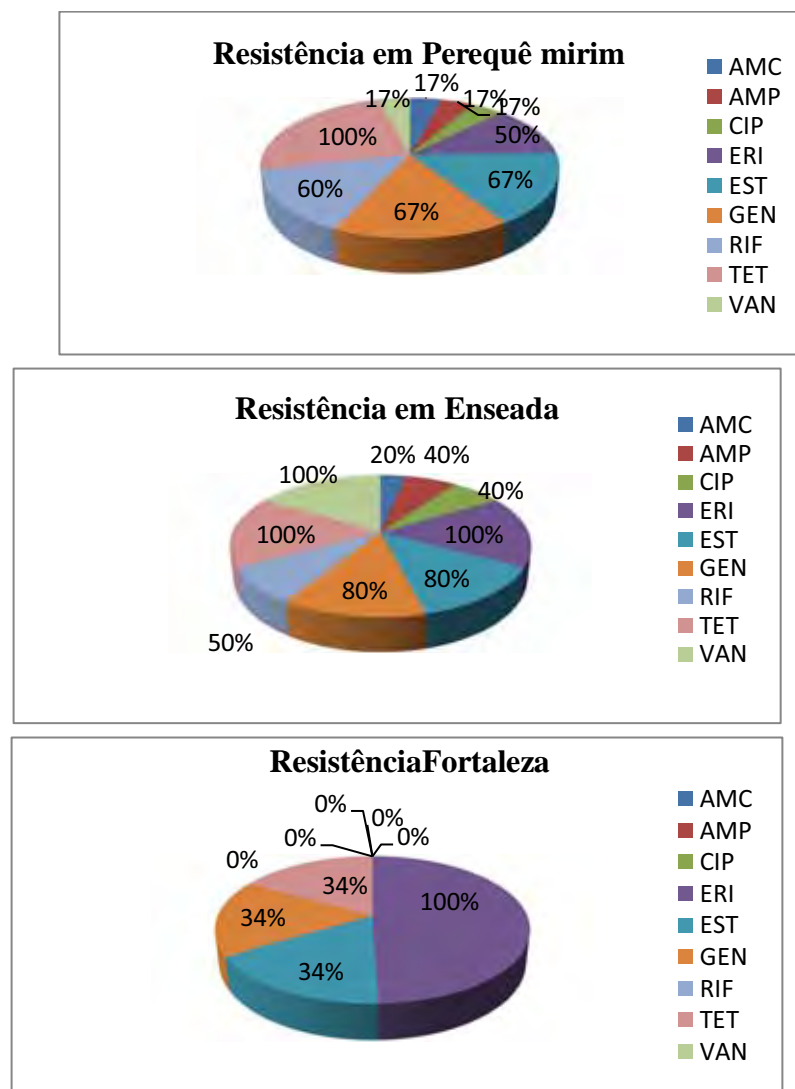


Fig.78. Resistência de *Enterococcus* sp em areia úmida

4.10.8. Outono-inverno-*Sargassum* sp

Na praia de Perequê Mirim 100% das cepas de *Enterococcus* sp apresentaram resistência a eritromicina; 50% resistentes a ampicilina, gentamicina e tetraciclina e todas as cepas apresentaram sensibilidade aos demais antibióticos (0% de resistentes) (Figura 79). Em Enseada houve sensibilidade a quase todos os antibióticos com exceção de eritromicina o qual 100% das cepas foram resistentes. Na praia de Fortaleza as amostras de *Sargassum* não apresentaram cepas *Enterococcus* sp resistentes, todas as testadas foram sensíveis a todos os antibióticos.



Fig.79. Resistência de *Enterococcus* sp em *Sargassum* sp

4.10.9. Primavera-verão- Água

Em Perequê Mirim 100% das cepas de *Enterococcus* sp foram resistentes a eritromicina e a rifampicina; 80% resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico e vancomicina; 60% resistentes a estreptomicina, gentamicina e tetraciclina; 40% resistentes a ampicilina e 0% de cepas resistentes a ciprofloxacina, todas as cepas foram sensíveis a este antibiótico. Na Enseada 100% das cepas foram resistentes a rifampicina; 80% de resistentes a estreptomicina e tetraciclina; 60% de resistentes a ampicilina; 40% de resistentes a ciprofloxacina, eritromicina e gentamicina e 20% de cepas resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico e vancomicina. Em Fortaleza, 75% das cepas foram resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico; 25% das cepas foram resistentes à gentamicina; 0% de cepas resistentes a

ciprofloxacina e 100% das cepas foram resistentes aos demais antibióticos utilizados (Figura80).

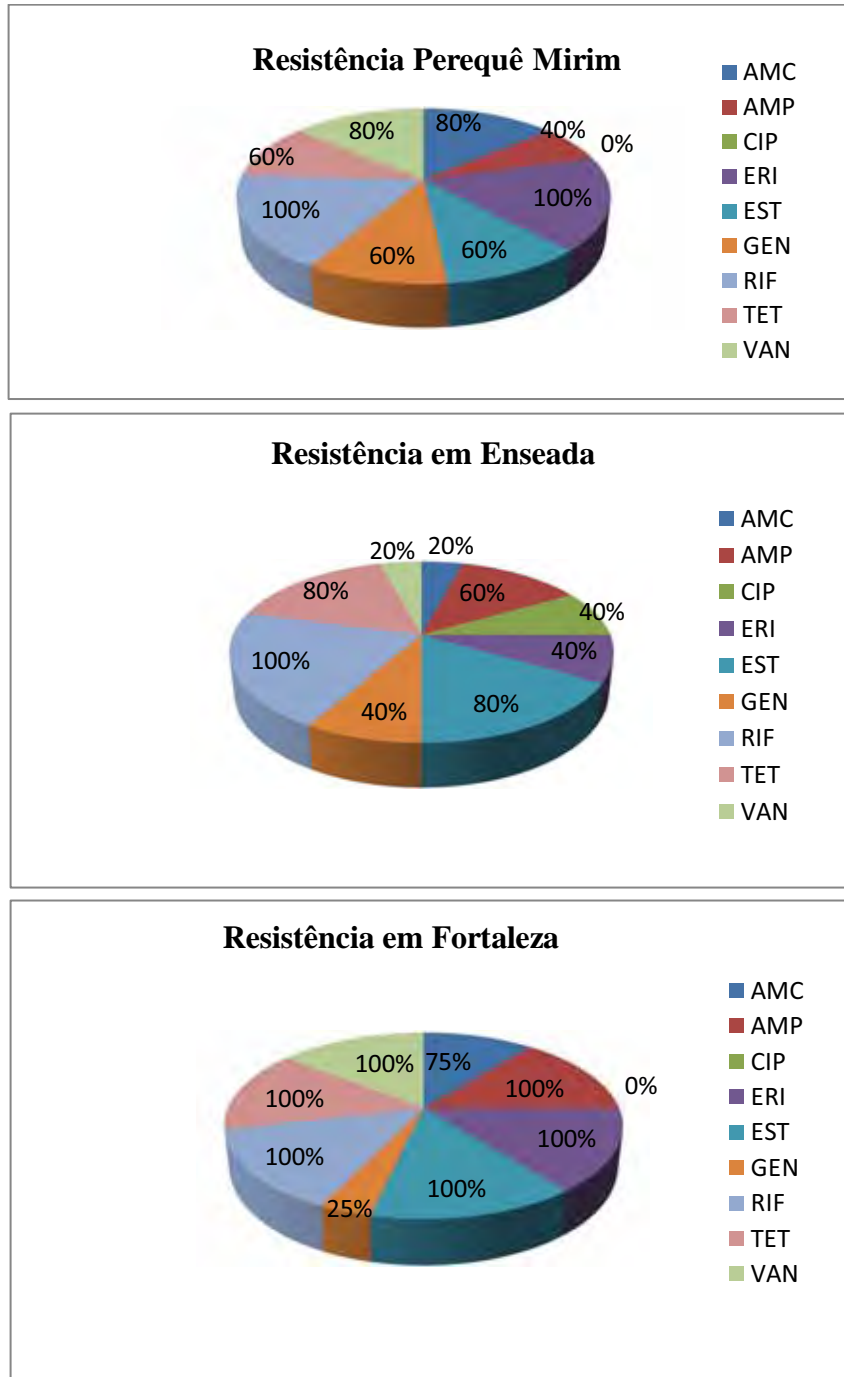
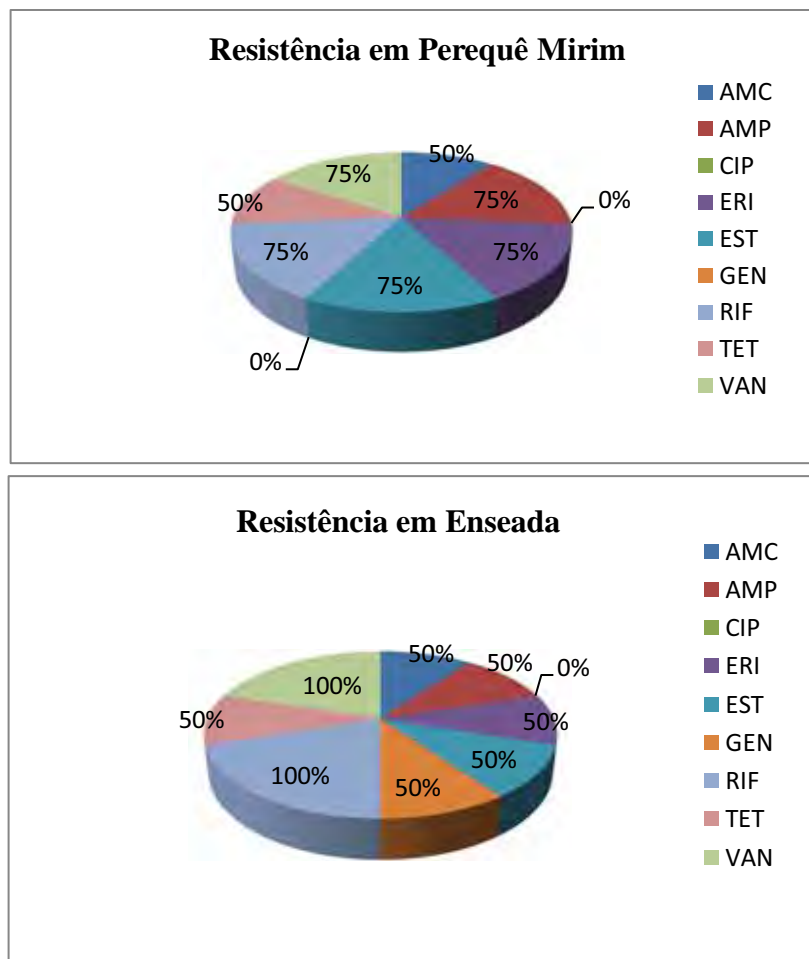


Fig.80. Resistência de *Enterococcus* sp em água

4.10.10. Primavera-verão- Areia seca

Em Perequê Mirim das cepas de *Enterococcus* sp testadas 75% foram resistentes aos antibióticos ampicilina, eritromicina, estreptomicina, rifampicina e vancomicina; 50% de resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico e tetraciclina e todas as cepas apresentaram sensibilidade a ciprofloxacina e gentamicina, com 0% de resistência a estes dois antibióticos. Na praia da Enseada 100% das cepas foram resistentes a rifampicina e vancomicina; 50% das cepas apresentaram resistência aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, eritromicina, estreptomicina, gentamicina e tetraciclina e 0% de resistência ao antibiótico ciprofloxacina. Em Fortaleza 100% das cepas foram resistentes à estreptomicina; 67% de cepas resistentes a eritromicina e tetraciclina; 33% de resistentes a rifampicina e 0% de cepas resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina e vancomicina (Figura 81).



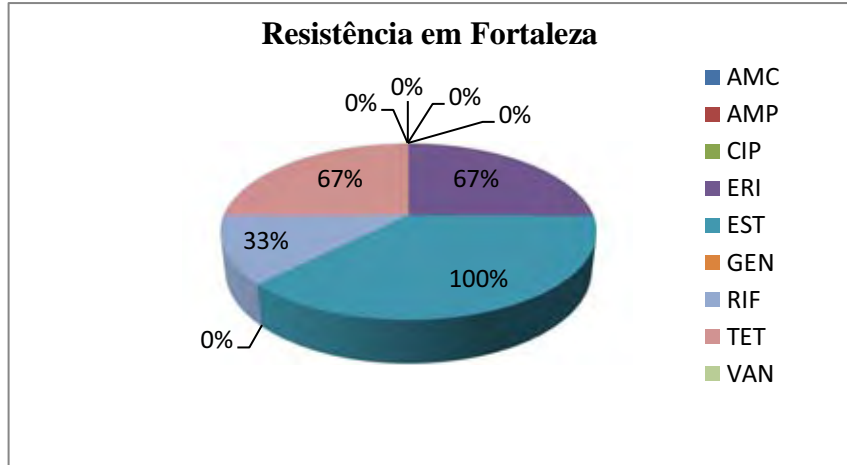


Fig.81. Resistência de *Enterococcus* sp em areia seca

4.10.11. Primavera-verão- Areia úmida

Na praia de Perequê Mirim 100% das cepas apresentaram resistência aos antibióticos eritromicina, estreptomicina, rifampicina e tetraciclina; 50% das cepas foram resistentes à gentamicina; 25% de resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico e vancomicina e 0% de resistência aos antibióticos ampicilina e ciprofloxacina. Na praia da Enseada, 100% das cepas de *Enterococcus* sp foram resistentes a eritromicina, estreptomicina, rifampicina e tetraciclina 50% de cepas resistentes a gentamicina e todas as cepas foram sensíveis aos demais antibióticos (0% de resistência). Em Fortaleza as cepas testadas apresentaram sensibilidade a quase todos os antibióticos, com exceção de eritromicina e estreptomicina os quais 100% das cepas foram resistentes (Figura 82).

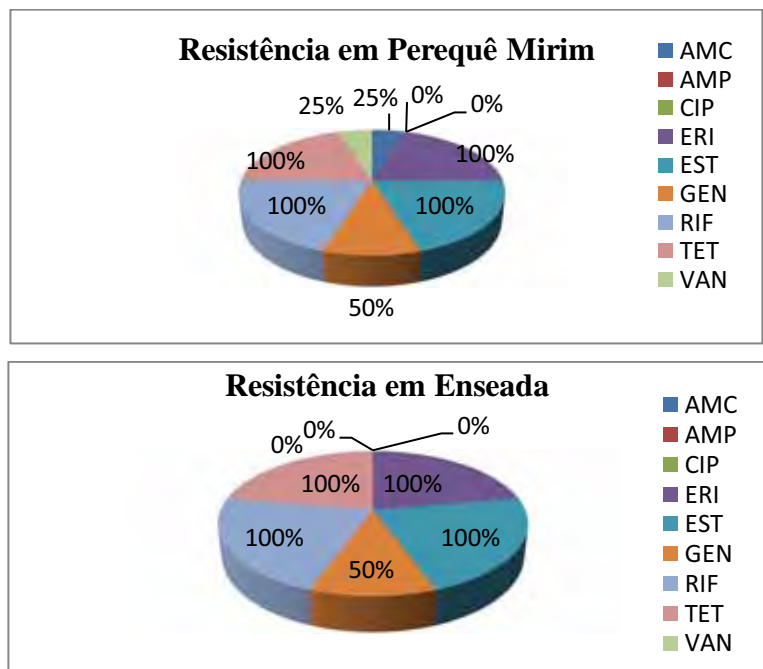


Fig.82. Resistência de *Enterococcus* sp em areia úmida

4.10.12. Primavera-verão- *Sargassum* sp

Para o *Sargassum* sp da praia do Perequê Mirim, das cepas de *Enterococcus* sp testadas 100% foram resistentes à estreptomicina e rifampicina; 83% resistentes a tetraciclina; 67% resistentes a eritromicina, 50% resistentes a gentamicina e vancomicina; 33% resistentes a amoxicilina+ ácido clavulânico e ampicilina e 0% de cepas resistentes a ciprofloxacina. Na praia da enseada das cepas testadas 100% foram resistentes a eritromicina, rifampicina e tetraciclina; 50% de resistentes a estreptomicina; 25% resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ciprofloxacina e vancomicina e todas as cepas foram sensíveis ao antibiótico gentamicina (0% de cepas resistentes). Para o *Sargassum* da praia de Fortaleza o teste não foi realizado para este período (Figura 83).

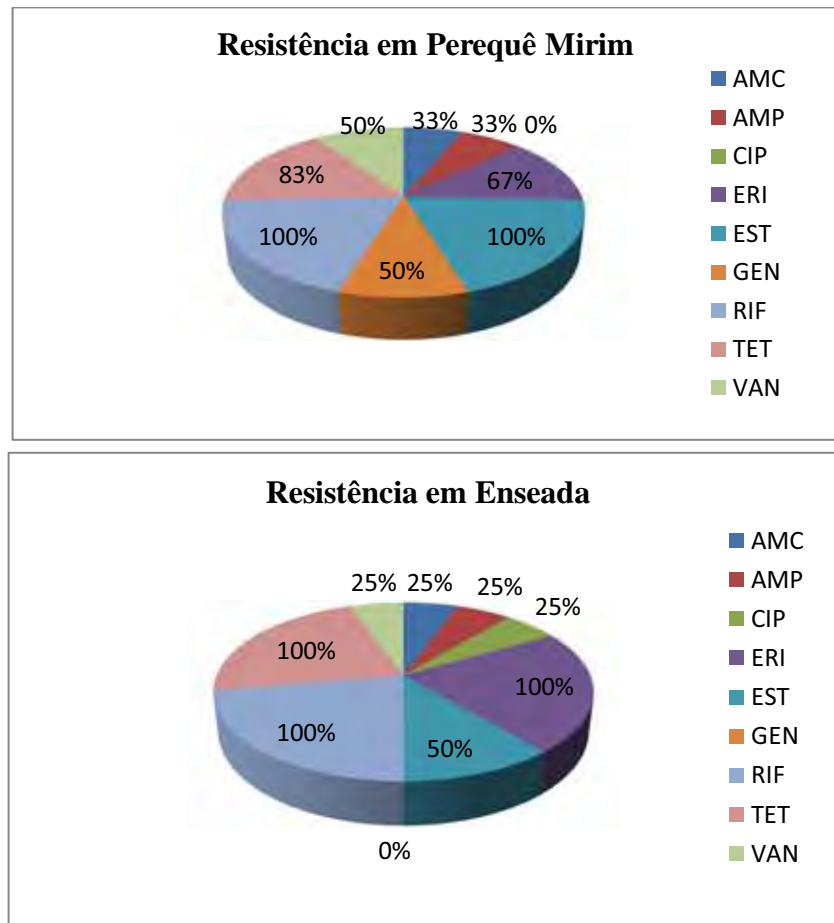


Fig.83. Resistência de *Enterococcus* sp em *Sargassum* sp

4.11. Análise estatística

Utilizou-se a correlação de Pearson para correlacionar as densidades de bactérias com as temperaturas das areias e águas, a salinidade da água do mar e com os níveis de precipitação no local de estudo. O nível de significância utilizado foi de 5% de correlação, ou seja, valores de $r < 0,05$ indicam que há correlação (positiva ou negativa) e para valores de $r > 0,05$ não há correlação.

A correlação de *Escherichia coli* na água do mar da praia de Perequê Mirim com a temperatura, foi negativa ($r = -0,2$); e com a precipitação também houve correlação negativa ($r = -0,08$). Não houve correlação das densidades com a salinidade da água do mar ($r = 0,06$). Já para a praia da Enseada a correlação foi negativa com a salinidade ($r = -0,1$) e com a temperatura ($r = -0,06$) e com a precipitação não houve correlação ($r = 0,07$). Para a água da praia da Fortaleza obteve-se correlação negativa das densidades com a salinidade ($r = -0,05$) e com a temperatura ($r = -0,1$) e com a precipitação não houve correlação ($r = 0,1$).

A comparação entre as três praias em relação à densidade de *Escherichia coli* foi feita através da análise de variância: teste de Friedman, que foi empregado também com nível de significância de 5% para verificar se houve variação significativa em relação às densidades das três praias. O teste resultou em $r = 0,08$, ou seja, a variação de densidade de *Escherichia coli* em água nas três praias não foi significativa.

Em relação às análises para a areia seca, na praia de Perequê Mirim, a relação entre as densidades e temperaturas resultou em um valor de $r = -0,3$ e a correlação com a precipitação também foi negativa ($r = -0,2$). Na praia da Enseada o valor obtido da correlação densidade x temperatura foi de $r = -0,2$ e para a correlação de densidade x precipitação $r = -0,1$. Na praia de Fortaleza a correlação densidade x temperatura foi de $r = -0,5$ já a correlação com a precipitação foi de $r = -0,08$. Nas três praias a correlação foi negativa entre as densidades e as temperaturas das areias e os volumes de precipitação, ou seja, as densidades foram maiores em temperaturas mais baixas e com médias de precipitação menores. O teste de Friedman também foi aplicado para verificar a variação da densidade na areia seca entre as três praias e o valor obtido foi de $r = 0,1$, portanto a variação não foi significativa para as densidades de *E. coli* em areia seca nas três praias.

Para a areia úmida da praia de Perequê Mirim a correlação densidade x temperatura foi de $r = -0,06$ e a correlação densidade x precipitação foi de $r = -0,4$; as correlações foram negativas indicando que quanto menores as temperaturas e os volumes de precipitação maiores foram as densidades. Na Enseada a correlação da densidade com a temperatura foi

negativa de $r = -0,1$ e para densidade x precipitação o valor foi de $r = 0,07$, ou seja, não houve correlação. Em Fortaleza a correlação da densidade x temperatura foi negativa de $r = -0,06$ e não houve correlação entre densidade x precipitação $r = 0,2$.

Aplicou-se o teste de Friedman para analisar a variação entre as três praias para as densidades de *E.coli* na areia úmida e obteve-se um valor de $r = 0,4$, ou seja, a variação de densidade de *Escherichia coli* na areia úmida entre as três praias não foi significativa.

Para as densidades de *E.coli* em *Sargassum* foi aplicado a correlação de Pearson para os volumes de precipitação. Em Perequê Mirim, não houve correlação entre as densidades de *E.coli* do *Sargassum* p1 e a precipitação ($r = 0,09$) já a correlação das densidades de *E.coli* do *Sargassum* p2 x precipitação foi negativa com ($r = -0,4$). Na praia da Enseada a correlação *Sargassum* p1 foi positiva ($r = 0,03$), ou seja, a densidade aumenta com o volume de precipitação. Já para as densidades de *E.coli* do *Sargassum* da praia de Fortaleza não houve correlação com os volumes de precipitação ($r = 0,7$).

Também utilizou-se a correlação de Pearson para relacionar as densidades de *Enterococcus* sp com os fatores abióticos: temperatura, salinidade e precipitação. Para a água da praia de Perequê Mirim a correlação densidade x temperatura foi negativa ($r = -0,2$) e a correlação densidade x salinidade também foi negativa ($r = -0,2$); portanto os aumentos nas densidades corresponderam à diminuição da salinidade da água do mar e da temperatura. Não correlação entre densidade x precipitação ($r = 0,4$). Na praia da Enseada houve correlação negativa para densidade x temperatura ($r = -0,4$), densidade x salinidade ($r = -0,1$) e para densidade x precipitação não houve correlação ($r = 0,1$). Em Fortaleza a correlação foi negativa para densidade x temperatura ($r = -0,02$), densidade x salinidade ($r = -0,1$) e densidade x precipitação ($r = -0,2$).

O Teste de Friedman foi aplicado para verificar a variação entre as densidades na água das três praias e o valor obtido foi significativo e positivo de $r = 0,008$, ou seja, a variação nas densidades foi significativa entre o ponto 1 da praia Perequê Mirim com o ponto 2 da praia da Enseada e entre o ponto 1 da praia Perequê Mirim com o único ponto na praia da Fortaleza.

Para a areia seca a correlação para a praia de Perequê Mirim, densidade x temperatura foi negativa ($r = -0,3$) e para densidade x precipitação não houve correlação ($r = 0,1$). Em Enseada não houve correlação para densidade x temperatura ($r = 0,06$) e densidade x precipitação ($r = 0,2$). Em Fortaleza as correlações foram negativas, densidade x temperatura ($r = -0,5$) e densidade x precipitação ($r = -0,2$).

Realizou o teste de Friedman para analisar a variação de densidade em areia seca nas três praias, obteve-se $r = 0,1$, ou seja, a variação na densidade de *Enterococcus* sp na areia seca entre as três praias não foi significativa.

A areia úmida da praia Perequê Mirim apresentou correlação negativa entre densidade x temperatura ($r = -0,4$) e não houve correlação entre densidade x precipitação ($r = 0,2$). Em Enseada a correlação foi negativa para densidade x temperatura ($r = -0,06$) e não houve correlação entre densidade x precipitação ($r = 0,3$). Em Fortaleza a correlação foi negativa para densidade x temperatura ($r = -0,4$) e densidade x precipitação ($r = -0,2$).

O teste de Friedman para analisar a variação das densidades de *Enterococcus* sp em areia úmida nas três praias foi realizado e obteve-se o valor de $r = 0,06$, portanto não houve variação significativa entre as três praias.

A correlação de Pearson foi realizada para as densidades de *Enterococcus* sp em *Sargassum* sp com os volumes de precipitação; para a praia de Perequê Mirim a correlação *Sargassum* p1 x precipitação foi negativa ($r = -0,1$), ou seja maiores densidades com médias de precipitações menores; *Sargassum* p2 x precipitação não houve correlação ($r = 0,2$). Em Enseada a correlação entre *Sargassum* x precipitação foi negativa ($r = -0,2$). E em Fortaleza não houve correlação entre as densidades de *Enterococcus* sp em *Sargassum* sp com as médias de precipitação ($r = 0,08$).

5. Discussão

O Programa de Balneabilidade das Praias da CETESB está estruturado para atender às especificações da Resolução CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente - nº 274/00, que define critérios para a classificação de águas destinadas à recreação de contato primário. Pelo critério adotado, densidades de *Escherichia coli* superiores a 800 UFC 100ml⁻¹ e de *Enterococcus* sp superiores a 100 UFC 100ml⁻¹ em duas ou mais amostras de um conjunto de cinco amostragens consecutivas, em um período igual ou inferior a cinco semanas, ou valores de 2000 UFC 100ml⁻¹ para *E. coli* e 400 UFC 100ml⁻¹ para *Enterococcus* sp na última medição, caracterizam a impropriedade da praia para recreação de contato primário (CETESB, 2010).

O presente trabalho utilizou como critério o valor de densidade máxima para a última medição, pelo fato de terem sido feitas apenas uma coleta a cada mês. Os dados obtidos pelo estudo mostraram que a água da praia de Perequê Mirim em relação às densidades de *Escherichia coli*, ultrapassou o valor de 2000 UFC 100 ml⁻¹ somente no mês de junho e outubro. As outras duas praias não ultrapassaram este valor. Para as densidades de *Enterococcus* sp verificou-se que nenhuma das praias ultrapassaram o valor de 400 UFC 100ml⁻¹ durante todos os meses de estudo. Entretanto segundo o relatório anual de balneabilidade da CETESB (2012) a praia de Perequê Mirim permaneceu imprópria durante os meses de janeiro a agosto. De setembro até dezembro ela permaneceu própria ao banho. Os resultados mostraram contaminação por *Escherichia coli* em outubro em Perequê Mirim a que não foi constatada pela CETESB.

A salinidade apresentou variação ao longo dos meses de estudo nas três praias, indicando que estas sofrem influência de descarga dos efluentes domésticos e da precipitação que ocorrem na região. De maneira geral, as densidades bacterianas na água do mar diminuíram com o aumento da salinidade da água. Quando bactérias entéricas são liberadas ao mar, ficam sujeitas a um aumento imediato da pressão osmótica decorrente do aumento da salinidade, apresentando altas taxas de inativação (BELKIN & COLWELL, 2006). Isto explica a correlação negativa entre a salinidade e as densidades bacterianas na água estudadas neste trabalho.

As densidades nas águas e areias apresentaram correlações negativas com as temperaturas nas três praias, entretanto com valores muito baixos, sugerindo que não houve correlação significativa para este parâmetro. Entretanto a sobrevivência de bactérias pode

aumentar consideravelmente em ambientes com altas temperaturas ou ser mascarada pela incidência de luz (DAVIES & EVISON, 1991; PINTO, 2007).

As densidades correlacionadas com as médias dos volumes de precipitação resultaram na maioria dos casos em relações negativas muito baixas, e em alguns casos não houve correlação. Sales *et al.* (2008) comparou a quantidade de UFC de bactérias em diferentes períodos sazonais (seco e chuvoso) e encontrou um número maior de bactérias no período chuvoso. Portanto a pluviosidade tem um papel importante na sobrevivência de bactérias nas areias por gerar um ambiente favorável a estes microrganismos.

As densidades bacterianas de *Escherichia coli* e de *Enterococcus* sp, foram maiores nas amostras de areias comparadas a coluna de água. Esta observação é semelhante aos resultados obtidos pelos estudos de Oliveira *et al.* (2007); Pinto (2007) e Siqueira (2007) nos quais areias e sedimentos tem mostrado densidades de microrganismos superiores aquelas encontradas na água.

Na água do mar os indicadores fecais podem sofrer inativação pelos raios solares e estão expostas a ação de bacteriófagos, baixa quantidade de nutrientes, predação e competição com organismos autóctones. As areias de praias agiriam como reservatórios de proteção para estes microrganismos protegendo contra a irradiação solar, bacteriovoria e competição, além de encontrarem condições favoráveis de disponibilidade de nutrientes (DAVIES-COLLEY, 1999; PINTO, 2007).

Fatores como as condições hidrodinâmicas e ambientais e agitação da superfície durante a realização de atividades recreacionais podem colaborar para a ressuspensão das bactérias presentes na areia, elevando, dessa forma suas densidades na coluna de água (SATO *et al.*, 2005; SIQUEIRA, 2007).

A Zona seca, localizada acima da maré alta, apesar de não ser lavada pelas águas marinhas sofre a ação de fatores externos, tais como lixo, urina e fezes de animais, além da própria contaminação humana, fatores que podem favorecer a proliferação e/ou permanência dos microrganismos patogênicos (SATO *et al.*, 2005; SIQUEIRA, 2007).

As algas marinhas são de grande importância econômica e são utilizadas em vários países na indústria alimentícia, de medicamentos, cosmética e agricultura (CABRAL *et al.*, 2011; VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004). A contaminação por microrganismos em algas pardas já foi evidenciada por Muller *et al.* (1998). Estes autores verificaram a presença de vírus patogênicos nestas algas. No presente estudo verificou-se altas densidades de bactérias fecais tanto de *Escherichia coli* quanto *Enterococcus* sp presentes em *Sargassum* sp nas três

praias analisadas . Estas algas vêm sendo utilizadas em muitos países como adubos de plantas que muitas vezes são utilizadas como alimentos e que servem como vias de contaminação.

A Praia do Perequê Mirim foi a que apresentou maior quantidade e maior variabilidade de cepas resistentes em relação às praias da Enseada e Fortaleza, as quais também apresentaram altas porcentagens de cepas resistentes ao longo das estações do ano. Maiores taxas de resistência foram encontradas em verão-outono e tanto para água quanto para areias e *Sargassum* sp, a quantidade de cepas resistentes foram muito altas sem variações significativas.

Em todas as praias analisadas as cepas de *Enterococcus* sp isoladas mostraram sensibilidade das cepas aos antibióticos ciprofloxacina. Altas porcentagens de cepas foram resistentes à estreptomicina, eritromicina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina. Cepas resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico e ampicilina foram encontradas em sua maioria na estação verão-outono e a maioria delas na praia de Perequê Mirim, contrariando a total suscetibilidade das cepas encontradas por Arvanitidou *et al.* (2001) e Junco *et al.* (2001) a estes antibióticos.

Durante as últimas décadas, o uso do antibiótico Amoxicilina se tornou amplamente disseminado e administrado de forma indiscriminada, sendo que estudos mostram que esse antibiótico apresenta uma taxa de resistência elevada, o que foi estabelecido no presente trabalho, e embora algumas das cepas na praia de Fortaleza tenham apresentado sensibilidade, os demais resultados são de grande preocupação.

Junco *et al.* (2001) e Rice *et al.* (1995) também isolaram cepas com alta resistência a aminoglicosídeos (estreptomicina e gentamicina) em águas recreacionais e em esgotos, enquanto Arvanitidou *et al.* (2001) obtiveram 57,3% de cepas resistentes a eritromicina.

Cepas de *Enterococcus* sp resistentes ao antibiótico vancomicina também foram encontradas nas três estações analisadas para as três praias, e isto é um fato preocupante, visto que este é o antibiótico de escolha no tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* sp com resistência múltipla a vários outros antibióticos (HUYCKE *et al.*, 1998). *Enterococcus* sp resistentes a vancomicina foram isolados em águas superficiais da Suécia e da Espanha por Kühn *et al.* (2000). Estes autores ressaltaram que a ocorrência de cepas resistentes a este antimicrobiano, bem como a existência de cepas resistentes a ampicilina no ambiente marinho, é fator preocupante diante da possibilidade da transferência desta resistência a outras bactérias (MARCINEK *et al.*, 1998; BLOM *et al.*, 2000; PINHATA, 2006).

A transferência de plasmídeos carreadores de resistência já foi documentada há muito tempo no ambiente marinho para várias espécies de bactérias, inclusive alta frequência, em sedimentos marinhos de transferência de plasmídeos que codificam a resistência à tetraciclina (SANDAA & ENGER, 1994; PINHATA, 2006).

Altas percentagens cepas resistentes de *Escherichia coli* foram encontradas nas três estações estudadas e para as três praias analisadas, entretanto algumas cepas sensíveis para estreptomicina e gentamicina na praia da Fortaleza. Na Enseada as cepas foram sensíveis à estreptomicina, gentamicina, rifampicina e tetraciclina e na praia do Perequê Mirim as cepas foram sensíveis a rifampicina. Contudo as análises mostraram que em relação aos demais antibióticos de 50 a 100% das cepas testadas foram resistentes a todos estes. Estudos de Canal (2010) mostrou a ocorrência cepas de *Escherichia coli* altamente resistentes aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina e tetraciclina. Devido a resistência das cepas aos beta-lactâmicos (amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina), segundo Livermore *et al.* (2001) é possível inferir sobre a presença de penicilinases em alguns isolados.

Alam *et al.* (2006) também encontrou altas taxas de cepas resistentes de *Escherichia coli* a tetraciclina e ampicilina em isolados obtidos em ambientes aquáticos como lagoas, rios lagos e outros reservatórios aquáticos.

Entre 100 a 60% das cepas de *Escherichia coli* das três praias foram resistentes ao antibiótico ciprofloxacina. Durante os últimos anos o uso de antibióticos mais fortes passou a ser difundindo como o uso de Ciprofloxacina que apresenta um elevado quadro de efeitos colaterais e não é usado como primeiro nível de tratamento e o padrão de resistência elevada a tal substância é de grande preocupação (HOOPER, 1987; KURASHIMA, 2012).

A presença de resistência múltipla foi encontrada tanto para as cepas de *Escherichia coli* quanto para as de *Enterococcus sp.* Análises de Schneider *et al.* (2009) ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de *E.coli* isoladas de amostras de água superficial mostraram que a frequência de resistência variou entre um a sete antimicrobianos, porém o maior número de isolados resistentes foi obtido para um antimicrobiano.

Os perfis de resistência encontrados em isolados de *E.coli* em ambientes aquáticos apresentam grande variabilidade, segundo as características originais da água. Segundo Watkinson *et al.* (2007) a resistência a antimicrobianos estava fortemente associada as águas superficiais adjacentes a estações de tratamento de esgoto do que as águas superficiais distantes destas. Gallert *et al.* (2005) observaram altos índices de resistência a penicilina, ampicilina e vancomicina em cepas isoladas de poços localizados perto de canos de emissão

de esgoto, já em um poço localizado distante deste ponto, verificaram a ausência de bactérias fecais (CANAL, 2010).

Os altos valores de resistência obtidos no presente estudo podem refletir o maior aporte de carga orgânica que atinge as praias no verão. Tendo em vista que, em áreas costeiras menos abrigadas, a dispersão de microrganismos no ambiente marinho é facilitada (BELKIN & COWELL, 2006).

6. Conclusões

Os resultados de densidades de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli* na água relacionados com os dados da CETESB, mostraram que a água estava imprópria ao banho na maior parte do tempo do período analisado para a praia do Perequê Mirim e em alguns meses para Enseada e Fortaleza, sendo que quando possíveis contaminantes atingem estas águas (esgoto doméstico, córregos, fezes de animais) a concentração de bactérias fecais aumenta consideravelmente.

Os valores altos de densidades de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp nas amostras de areias demonstram que é necessário que haja programas de monitoramento para areias de praias, pois podem ser uma fonte importante de contaminação.

Durante a alta temporada, as densidades são geralmente mais elevadas, devido à alta concentração de pessoas nas praias e aumento nos despejos de esgoto e lixo.

As densidades de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp em algas do gênero *Sargassum* são altas nos meses de alta temporada e nos meses de inverno, geralmente com concentrações maiores em algas mais próximas a praia. Isto é devido à córregos que despejam esgoto nas praias e aos lixos jogados pelas pessoas que vivem ali ao redor.

Assim como para areia, não existe uma legislação com limites de densidades de bactérias contaminantes para algas ou para outros organismos nas praias que ficam vulneráveis a contaminação por micro-organismos patogênicos.

As densidades de ambas as bactérias foram influenciadas pela salinidade da água do mar de forma negativa, onde os aumentos em salinidade acarretaram em diminuição na densidade de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli* ou vice-versa.

A temperatura aparentemente não constituiu um fator limitante para as densidades de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp entretanto, verificou-se um aumento nas densidades de ambas as bactérias nos meses de outono-inverno. Isto ocorreu devido ao aumento dos níveis de precipitação nos dias das coletas.

A resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp foi muito alta nas três praias analisadas, sendo que as maiores taxas de cepas resistentes foram encontradas na estação verão-outono para as cepas de *Enterococcus* sp. Para *E.coli* não houve muita variação, pois altas taxas de cepas resistentes foram encontradas em todas as estações. Cepas resistentes foram encontradas em altas porcentagens na água, nas areias e no *Sargassum* sp, sem variação significativa entre estes.

Águas recreacionais doces e marinhas e as areias das praias podem contribuir para a disseminação da resistência entre bactérias, o que, ao longo do tempo, pode tornar o uso de alguns antibióticos, entre eles os de última geração, ineficientes contra determinadas infecções.

7. Referências Bibliográficas

ALM, E.W.; BURKE, J.; SPAIN, A. Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. **Water Res.**, v.37, n.16, p.3978-3982, sept. 2003.

ALAM, M.; AHSAN, S.; PAZHANI, G.P.; TAMURA, K.; RAMAMURTHY, T.; GOMES, D.J.; RAHMAN, S.R.; ISLAM, A.; AKHTAR, F.; SHINODA, S.; WANATANABE, H.; FARUQUE, S.M.; NAIR, G.B. Phenotypic and molecular characteristics of *Escherichia coli* isolated from aquatic environment of Bangladesh. **Microbiology and Immunology**, v.50, n.5, p.359-370, 2006.

AN, Y.J.; KAMPBELL, D.H.; BREIDENBACH, G.P. *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. **Environ. Pollut.**, v.120, n.3, p.771-778, 2002.

APHA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. **APHA, AWWA, WEF**. 20th Edition. 2005. 1120p.

ARVANITIDOU, M.; KATSOUYANNOPOULOS, V.; TSAKRIS, A. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. **J. Med. Microbiol.**, v.50, p.1001-1005, nov. 2001.

BELKIN, S.; COLWELL, RR. Oceans and health : pathogens in the marine environment. **Springer**, v.1, p. 69-92, 2006.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 3^a ed. São Paulo: Melhoramentos, 1994. p.615-9; 658-9; 930-1; 938-9.

BLOM, M.; SORENSEN, T.L.; POULSEN, R.L.; FRIMODT-MOLLER, N.; MONNET, D.L.; AARESTRUP, F.M.; ESPERSEN, F. Ingestion of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* strains of food animal origin by human healthy volunteers: a randomized double-blind study. In: 40th **ICAAC Abstracts**. Ontario, Canada. p.432. 2000.

BRASIL. Resolução CONAMA n° 274, de 29 de novembro de 2000. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n.18, 25 jan 2001. Seção 1, p. 70-71.

BROW, D. **Caribe invadido por algas de Sargaço**. São Paulo: envolverde, jornalismo & sustentabilidade, 2012. Disponível em: <<http://envolverde.com.br/ips/inter-press-service-reportagens/caribe-invadido-por-algas-de-sargaco/>>. Acesso em: 16 mai.2013.

BRUNKE, M.; FISCHER, H. Hyporheic bacteria – relationships to environmental gradients and invertebrates in a prealpine stream. **Arch. Hydrobiol.**, v.146, n.2, p.189-217, 1999.

CABELLI, V.J.; DUFOUR, A.P.; MCCABE, L.J.; LEVIN, M.A. Swimming-associated gastroenteritis and water quality. **Am. J. Epidemiol.**, v.115, n.4, p.606-616, 1982.

CABRAL, I. S. R., SHIRAHIGUE, L. D., ARRUDA, L.F., CARPES, S. T., OETTERER, M. Produtos Naturais de Algas Marinhas e seu Potencial Antioxidante e Antimicrobiano. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 29, p. 181-192. 2011.

CANAL, N. **Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isoladas das amostras de água da Lagoa dos Patos, RS.** 98p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Microbiologia agrícola e do ambiente)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2010.

CETESB (São Paulo). **Relatório de qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo: balneabilidade das praias 2000-2010.**

CIIAGRO- Centro integrado de informações agrometeorologias-<http://www.ciiagro.sp.gov.br> acesso em 18 fev.2013.

CRABILL, C.; DONALD, R.; SNELLING, J.; FOUST, R.; SOUTHAM, G. The impact of sediment fecal coliforms reservoirs on seasonal water quality in Oak Creek. **Water Res.**, v.33, n.9, p.2163-2171. june 1999.

DAVIES, C.M.; BAVOR, H.J. The fate of storm water associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. **J. Appl. Microbiol.**, v.89, n.2, p.349-360, aug. 2000.

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.

DAVIES, C.M.; LONG, J.A.H.; DONALD, M.; ASHBOLT, N.J. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, n.5, p.1888-1896, may 1995.

DAVIES-COLLEY, R.J; DONNISON, A.M.; SPEED, D.J.; ROSS, C.M.; NAGELS, J.W. Inactivation of fecal indicator microorganisms in waste stabilization ponds: interactions of environmental factors with sunlight. **Water Res.**, v.33, n.5, p.1220-1230, apr. 1999.

D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; LEMOS, S.K. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brasil. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.35, n.3, p.199-204, july/sept. 2004.

FACKLAM, R.R.; COLLINS, M.D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, n.4, p.731-734, apr. 1989.

FRIEDEN, T.R.; MUNSIFF, S.S.; LOW, D.E.; WILLEY, B.M.; WILLIAMS, G.; FAUR, Y.; EISNER, W.; WARREN, S.; KREISWIRTH, B. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. **Lancet**, v.342, p.76-79, july 1993.

GALLERT, C.; FUND, K.; WINTER, J. Antibiotic resistance bacteria in raw and biologically

treated sewage and groundwater bellow leaking sewers. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.69, n.1, p.106-112, 2005.

GHINSBERG, R.C.; LEIBOWITZ, P.; WITKIN, H.; MATES, A.; SEINBERG, Y.; BAR, D.L.; NITZAN, Y.; ROGOL, M. Monitoring of selected bacteria and fungi in sand and seawater along the Tel Aviv coast. **MAP Tech. Rep. Ser.**, v.87, p.65-81, 1994.

HANCOCK, L.E.; GILMORE, M.S. **Pathogenicity of Enterococci**. In: Fischetti, V. et al. (ed.). Gram-Positive Pathogens. Washington D.C.: ASM Publications. Disponível em:<http://www.enterococcus.ouhsc.edu/lynn_revirew.asp>. Acesso em: 14 set. 2006.

HARWOOD, V.J; WHITLOCK, J.; WITHINGTON, V. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, n.9, p.3698-3704, sept. 2000.

HOOPER, D.C; WOLFSON, J.S; NG, E.Y; SWARTS, M.N. Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. **The American Journal of Medicine** [1987, 82(4A):12-20.

HUYCKE, M.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M.S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, n.2, p.239-249, apr./june 1998.

JUNCO, M.T.T.; MARTÍN, M.G.; TOLEDO, M.L.P.; GÓMEZ, P.L.; BARRASA, J.L.M. Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. **Int. J. Hyg. Environ. Health.**, v.203, p.363-368, 2001.

KÜHN, I.; IVERSEN, A.; BURMAN, L.G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; FRANKLIN, A.; FINN, M.; AARESTUP, F.; SEYFARTH, A.-M.; BLANCH, A.R.; TAYLOR, H.; CAPLIN, J.; MORENO, M.A.; DOMINGUEZ, L.; MÖLLBY, R. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment. Example of an ongoing project within the European research programme. **Int. J. Antimicrobial Agents.**, v.14, n.4, p.337-342, 2000.

KURASHIMA, E.S. **Análise de resistência a antibióticos em bactérias do gênero *Enterococcus* em praias de Ubatuba**. 2012. 51p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São Vicente, 2012.

LALIBERTE, P.; GRIMES, D.J. Survival of *Escherichia coli* in lake bottom sediment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.43, n.3, p.623-628, mar. 1982.

LIVERMORE, D.M.; WINSTANLEY, T.G.; SHANNON, K.P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **Journal of Antimicrobial chemotherapy**, v. 48, p. 87-102, 2001.

MARCINEK, H.; WIRTH, R.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; GAUER, M. *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, n.2, p.626-632, feb. 1998.

MEIRELLES-PEREIRA, F.; PEREIRA, A.M.S.; SILVA, M.C.G.; GONÇALVES, V.D.;

- BRUM, P.R.; CASTRO, E.A.R.; PEREIRA, A.A.; ESTEVES, F.A.; PEREIRA, J.A.A. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.33, n.4, p.287-293, 2002.
- MENDES, B.; NASCIMENTO, M.J.; OLIVEIRA, J.S. Preliminary characterization and proposal of microbiological quality standard of sand beaches. **Water Sci. Technol.**, v. 27, p.453-456, 1993.
- MULLER, D.G & FRENZER, K. Virus infections in three marine brown algae: *Feldmania irregularis*, *F.simplex* and *Ectocarpus siliculosus*. **Hydrobiologia** 260/261: 37-44. 1993
- MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.3, n.1, p.46-65, jan. 1990.
- MURRAY, B.E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, n.1, p.37-47, jan./mar. 1998.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 8^a ed. v.23, n.1. 2003.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty First informational supplement. NCCLS document M100-S21. v.31,n.1. Wayne, PA. 2011.
- OBIRI-DANSO, K.; JONES, K.; PAUL, N. The effect of the time of sampling on the compliance of bathing water in NW England with the EU Directive on bathing water quality. **J. Coast Conserv.**, v.5, n.1, p.51-58, 1999.
- OBIRI-DANSO, K.; JONES, K. Distribution and seasonality of microbial indicators and thermophilic campylobacters in two freshwater bathing sites on the River Lune in northwest England. **J. Appl. Microbiol.**, v.87, p.822-832, jul.1999.
- OLIVEIRA, A.J.F.C.; HOLNAGGEEL, H.C; MESQUITA, H.S.L; FONTES, R.F.C. Physical, chemical and microbiological characterization of the intertidal sediments of Perequê beach, Guarujá (SP), Brazil. **Mar. Poll. Bull.** V. 54, P. 921-927.2007.
- OLIVEIRA, A.J.F.C.; PINHEIRO, M.A.A.; FONTES, R.F.C. **Panorama Ambiental da Baixada Santista**. 1. ed. São Vicente: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho,2008.127p.
- OSHIRO, R.; FUJIOKA, R. Sand, soil and pigeon droppings: sources of indicator bacteria in the waters of Hanauma Bay, Oahu, Hawaii. **Water Sci. Technol.**, v.31, p.251-254, 1995.
- PAPADAKIS, J.A.; MAVRIDOU, A.; RICHARDSON, S.C.; LAMPIRI, M.; MARCELOU, U. Bather-related microbial and yeast populations in sand and seawater. **Water Res.**, v.31, n.4, p.799-804, apr. 1997.
- PEREIRA, P.H.C., BIASI, P.C., JACOBUCCI, G.B. Dinâmica populacional e distribuição espacial de *Tricolia affinis* (Molluca: Gastropoda) associados a *Sargassum* spp no litoral norte de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecias** 12 (1): 7-16. 2010.

- PINHATA, J.M.W. **Resistência a antimicrobianos de Enterococos isolados de areias e águas recreacionais marinhas**. 2006. 49p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São Vicente, 2006.
- PINTO, A.B. **Densidade de bactérias do grupo Enterococcus sp na água do mar e nas areias de praias do município de São Vicente e sua relação com parâmetros abióticos**. 2007. 39p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São Vicente, 2007.
- RAVEN, P.H. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.,2001. 906p.
- REVIERS, B.D. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed., 2006. 280p.
- RICE, E.W.; MESSER, J.W.; JOHNSON, C.H.; REASONER, D.J. Occurrence of High-level Aminoglycoside Resistance in Environmental Isolates of Enterococci. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, n.1, p.374-376, jan. 1995.
- ROBLEDO, D.R.; SOSA, P.A.; GARCIA-REINA G. & MULLER, D.G. Photosynthetic performance of healthy and virus infected *Feldmania irregularis* and *F. simplex* (*Phaeophyceae*). **European journal of Phycology**, 29 (4): 247-251. 1994.
- SANDAA, R.A.; ENGER, O. Transfer in Marine Sediments of the Naturally Ocurring Plasmid pRAS1 Encoding Multiple Antibiotic Resistance. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, n.12, p.4234-4238, dec. 1994.
- 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, Brazil. **Braz. J. Microb.**, v.36, n.4, p.321-326, oct./dec. 2005.
- SCHNEIDER, R.N.; NADVORNY, A.; SHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de água superficial e subterrânea em área de produção de suínos. **Biotemas**, v.22, n.3, p.11-17, 2009.
- SCHWARTZ, T.; KOHNEN W.; JANSEN, B.; OBST, U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **Microb. Ecol.**, v.43, n.3, p.325-335, apr. 2003.
- STEPHENSON, G.R.; RYCHERT, R.C. Bottom sediment: a reservoir of *Escherichia coli* in rangeland streams. **J. Range Manage.**, v.35, p.119-123, 1982.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, n.3, p.281-301, mai/jun, 2000.
- VIDOTTI, E. C. e ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: Da Economia nos Ambientes Aquáticos à Biorremediação e à Química Analítica. 2004. **Química Nova**, v. 27, Nº 1, p. 139-145.

VILLAR, C.; DE CABO, L.; VAITHIYANATHAN, P.; BONETTO, C. Pore water N and P concentration in a floodplain marsh of the Lower Parana River. **Hydrobiologia.**, v. 392, n.1, p.65-71, jan. 1999.

WATKINSON, A.J.; MICALIZZI, G.B.; BATTES, J.B.; CONSTANZO, S.D. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* wastewater, surface water and oysters from an urban riverine system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.7, p. 5667- 5670, 2007.

WHITMAN, R.L.; NEVERS, M.B. Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of a Lake Michigan beach. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, n.9, p.5555-5562, sept. 2003.

WHO. **Guidelines for Safe Recreational waters – Water Environments.** Volume 1: Coastal and Fresh-Waters. WHO/EOS/98.14, World Health Organization, Geneva, 1998. 208p.