

Densidade e diversidade de fenótipos de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus sp*, *Escherichia coli* e *Aeromonas sp* isoladas de água, sedimento e mexilhão coletados em Santos e Itanhaém, São Paulo, Brasil

Raphaela Sanches de Oliveira

**São Vicente
2016**

UNIVERSIDADE ESTARUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

CAMPUS DO LITORAL PAULISTA

Densidade e diversidade de fenótipos de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus sp*, *Escherichia coli* e *Aeromonas sp* isoladas de água, sedimento e mexilhão coletados em Santos e Itanhaém, São Paulo, Brasil

Aluna: Raphaela Sanches de Oliveira

Orientadora: Prof. Dra. Ana Julia Fernandes

Co Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri

Dissertação apresentada ao Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Aquática.

**São Vicente
2016**

576.1 Oliveira, Raphaela Sanches de

OI41 Densidade e diversidade de fenótipos de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus sp*, *Escherichia coli* e *Aeromonas sp* isoladas de água, sedimento e mexilhão coletados em Santos e Itanhaém, São Paulo, Brasil. / Raphaela Sanches de Oliveira. - São Vicente, 2017.

62 p.: il, figs., gráfs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.

Orientadora: Ana Julia Fernandes

Co-orientador: Edison Barbieri

1. Microbiologia ambiental. 2. Poluição marinha.
3. Mexilhão Perna Perna – Contaminação. 4. Bactérias. 5.
Resistência antimicrobiana. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP

Campus do Litoral Paulista

*Dedico a toda minha família que, através de seu apoio e carinho, contribuíram
com todas as minhas conquistas.*

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 dos meus olhos.

(Isaac Newton)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Moisés e Aliete, que sempre me apoiaram e me deram condições para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos, e chegar até onde cheguei, sem eles nada seria possível. Em especial a minha mãe que me fez chegar até aqui, sem medir esforços. Aos meus irmãos, José e Geovana, pelo apoio. Nunca terei palavras para agradecer tudo que fizeram por mim.

Aos meus avôs, Jose e Títo e a minha vó Dolores, que mesmo com toda sua simplicidade estava sempre disposta a me ajudar, me dando total apoio, me fazendo sempre seguir em frente, disposta a mudar de cidade para me acompanhar. As minhas tias, tios e primos, muito obrigado.

A todos os meus amigos que sempre esperavam a minha volta me proporcionando momentos incríveis, renovando e recarregando minhas energias, meu muito obrigado. Babi, não tenho palavras para agradecer todo apoio e palavras de incentivo, me trazendo calma e força para terminar. As meninas, Ju, Gi, Carol, Mari, Aline, Gui, Malu, as Paty's, muito obrigada por cada conversa. As minhas companheiras de Unesp, Amanda, Prema, saibam que mesmo de longe sempre estiveram perto, para uma conversa, uma dúvida, uma ajuda, obrigada por tudo, eu amo vocês.

Ao MicroMar, obrigada por toda hospitalidade, apesar do nosso cantinho ser pequeno, nos sempre nos entendemos e a colaboração é constante. Um agradecimento especial a Sonia, Roberta, Vanessa, Aline, Bruna, Eliete, meu muito obrigada, não tenho palavras para agradecer tudo que fizeram por mim, sem vocês nada seria possível. Ro, saiba que você foi essencial para a conclusão deste trabalho, só tenho a agradecer cada estadia, cada corrida na Unesp para me socorrer, cada "Calma, vai dar tudo certo". Sonia você também, não tenho palavras para agradecer cada ajuda, cada maratona de laboratório, cada texto revisado, muito obrigada, você também foi essencial para a conclusão. Aline, mesmo de longe e com sua vida de Super-Mãe sempre arrumando um tempinho para me ajudar.

A todos da Unesp CLP, Marcia, Luciana, Wagner, Yasmim, muito obrigada pela ajuda, por cada material separado. A Conceição, Fabiana, Hana, Paulo, a todos que sempre estavam dispostos a me ajudar.

Muito obrigada aos meus professores, vocês foram essências para minha formação. Em especial ao prof Marcelo Pinheiro, obrigada por cada ajuda, cada conversa, cada risada. Ao prof Felipe, que me ajudou em momentos tão complicados. Ao prof Bob, que sempre estava disposto a contribuir para minha formação. Meu muito obrigada a cada um de vocês.

Por fim, quero agradecer imensamente a minha orientadora prof Ana Julia, muito obrigada por me aceitar em seu laboratório desde a graduação me ensinando, sempre contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal. Não tenho palavras para expressar toda minha gratidão, em momentos muito difíceis, você foi minha segunda mãe, só tenho agradecer a cada conversa, cada risada, cada momento que me acolheu em sua casa, acima de uma grande professora é uma grande amiga. Obrigada por acreditar em mim mais uma vez, proporcionando a conclusão deste trabalho.

Enfim meu muito obrigada a todos que participaram e me ajudaram de alguma maneira para que eu pudesse chegar ate aqui.

Resumo

O desenvolvimento urbano em áreas costeiras tem ocorrido intensamente e o aumento das descargas de esgotos domésticos é uma das consequências desta expansão e motivo de preocupação para a saúde pública. Assim a qualidade microbiológica das águas, sedimentos e alimentos de origem marinha devem ser monitoradas, principalmente os organismos filtradores como os mexilhões, *Perna perna*. *moluscos bivalves*, por filtrarem a água para obtenção de alimento e oxigênio, concentram material em suspensão nos seus tecidos, inclusive bactérias patogênicas resistentes a substâncias antimicrobianas, o que os torna uma fonte potencial de contaminação humana por patógenos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a densidade e resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* sp, *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp isolados dos tecidos de mexilhão *Perna perna*, água e sedimento coletados em Santos e Itanhaém, Estado de São Paulo. Como resultado observa-se que as densidade de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli* encontradas na água dos dois pontos de coleta estão dentro das normas da Resolução Conama 274/2000, já as densidades encontradas nos sedimentos e em tecidos moles dos mexilhões foram elevadas. Para *Aeromonas* sp não existe padrão, pois as mesma não estão presentes na legislação. Observou-se também altas frequências de resistência bacteriana aos antimicrobianos. Os resultados obtidos sugerem que pode haver uma questão importante para a saúde pública, pois foram encontrados microrganismos apresentando múltipla resistência aos antibióticos analisados, sendo que apenas a ciprofloxacina se mostrou mais eficiente para os três microrganismos analisados. Tendo em vista os resultados obtidos foi possível concluir a existência de situação preocupante, pois os microrganismos testados se mostram altamente resistentes a múltiplos antimicrobianos, gerando um grande problema de saúde pública.

Palavras chaves: *Aeromonas* sp, antibióticos, contaminação ambiental, *Enterococcus* sp, *Escherichia coli* manipulação alimentar, mexilhão *Perna perna*

Abstract

Urban development in coastal areas has occurred intensely and the increase in discharges of domestic sewage is one of the consequences of this expansion and cause of concern for public health. Thus the microbiological quality of the waters, sediments and foods of marine origin must be monitored, mainly the filtering organisms like the mussels, *Perna perna*, bivalve molluscs, in view of the fact that by filtering the water to obtain food and oxygen they concentrate suspended material in their tissues, including pathogenic bacteria resistant to antimicrobial substances, which makes them a potential source of human contamination by pathogens. The objective of the present study was to evaluate the density and antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp, *Escherichia coli* and *Aeromonas* sp isolated from tissues mussel *Perna perna*, water and sediment collected in Santos and Itanhaem, São Paulo State. As a result, it was observed that the density *Enterococcus* sp and *Escherichia coli* found in the water of the two collection points were within the norms of Conama Resolution 274/2000, since the densities found in the sediments and soft tissues of the mussels were high. For *Aeromonas* sp there is no standard because they are not present in the legislation. Equally, it was observed high rates of antimicrobial resistance. The results suggest that there may be an important issue of public health, since microorganisms were found to have multiple resistance to the analyzed antibiotics, once ciprofloxacin was the most efficient against the three microorganisms analyzed. A worrisome situation is concluded because the tested microorganisms are highly resistant to multiple antimicrobials, resulting in a great public health problem.

Key words: antibiotics, *Aeromonas* sp, environmental contamination, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp, food handling, mussel *Perna perna*.

Sumário

1.0 Introdução.....	11
2.0 Objetivo.....	17
3.0 Metodologia.....	17
3.1 Determinação da densidade de <i>Enterococcus</i> SP.....	19
3.1.1. Água.....	19
3.1.2 Mexilhões.....	20
3.1.3 Areia/Sedimento.....	21
3.2 Determinação da densidade de <i>Escherichia coli</i>.....	22
3.2.1 Água.....	22
3.2.2. Mexilhões.....	22
3.2.3 Areia/Sedimento.....	23
3.3 Determinação da densidade de <i>Aeromonas sp</i>.....	23
3.3.1 Água.....	23
3.3.2. Mexilhões.....	24
3.3.3 Areia/Sedimento.....	24
3.4 Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	25
4.0 Resultados e Discussão.....	28
4.1 Densidades.....	28
4.2 Relação entre a densidade de microrganismos e sua resistência	30
4.3 Resistência a antimicrobianos de <i>Enterococcus sp</i>	31
4.4 Resistência a antimicrobianos de <i>Escherichia coli</i>	38
4.5 Resistência a antimicrobianos de <i>Aeromonas sp</i>	44
5.0 Conclusão.....	51
6.0 Referências Bibliográficas.....	53

1.0 Introdução

As regiões costeiras oferecem muitos benefícios ao homem, como obtenção de alimento, atividades econômicas, práticas de esporte e lazer, entre outros, ocasionando um desenvolvimento populacional elevado. Esse desenvolvimento por sua vez acarreta uma produção elevada de lixo e esgoto, sendo que esta produção nem sempre é acompanhado de infraestrutura de saneamento básico. Este fato leva a uma grande preocupação em relação à qualidade das águas e areias recreacionais (Oliveira *et al.*, 2008).

O crescente desenvolvimento das cidades litorâneas tem gerado diversos impactos ambientais. Embora essa relação seja há muito tempo conhecida, apenas recentemente começou a ser dada a devida atenção aos impactos que o desenvolvimento dessas áreas pode causar ao ecossistema marinho, bem como à saúde da população.

A poluição dos ecossistemas costeiros é um grave problema ambiental. A descarga de contaminantes em áreas marinhas é influenciada por vários fatores, incluindo a distribuição espacial da população. Dessa maneira, considerando que a grande maioria da população vive nessas áreas, a tendência é que esse número continue a crescer, e a pressão sobre os ecossistemas também (Elofsson *et al.*, 2003).

O principal impacto antropogênico ocasionado pelo aumento populacional em cidades litorâneas é o despejo de esgoto doméstico *in natura* diretamente no mar, elevando significativamente a carga orgânica lançada nesse ambiente (Sato *et al.*, 2005). Além disso, o despejo de efluentes carrega uma grande variedade de microrganismos patogênicos como bactérias, vírus e protozoários. A presença desses microrganismos pode ocasionar doenças de veiculação hídrica aos banhistas, como gastroenterites, hepatite A, cólera e até dermatoses (WHO, 1998).

Embora a incidência de tais doenças dependa de vários fatores como o grau de poluição da água, o tipo e o tempo de exposição, a situação imunológica do banhista, entre outros (Bartram & Rees, 2000), o monitoramento da qualidade das águas recreacionais marinhas deve ser considerado parte vital dos programas de gerenciamento costeiro integrado (Afifi *et al.*, 2000) devido ao risco que podem oferecer à saúde pública.

Além da ausência de sistemas de tratamento de esgotos, outros fatores podem propiciar o aumento da contaminação das praias: o dimensionamento inadequado de emissários e sistemas de tratamento de esgotos, a existência de ligações inadequadas da

rede de esgotos à rede pluvial, a existência de córregos fluindo ao mar, a ocorrência de chuvas e as condições de maré (CETESB, 2007).

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). O programa de balneabilidade está estruturado para atender à Resolução CONAMA nº274/2000. 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* (figura 1).

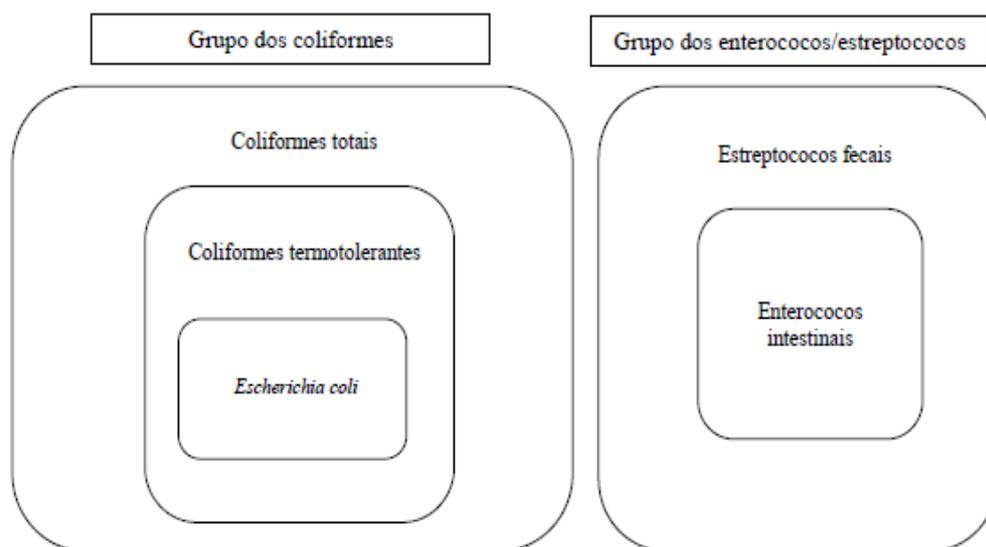


Figura 1. Grupo de microorganismos indicadores de poluição fecal (Cetesb, 2010)

O critério adotado pela CETESB para águas marinhas é o seguinte: densidades de *Enterococcus* superiores a 100 UFC 100 mL⁻¹, em duas ou mais amostras de um conjunto de cinco semanas, ou valores superiores a 400 UFC 100 mL⁻¹ 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).

Atualmente bactérias do grupo *Enterococcus* são consideradas como um indicador de excelência para a classificação das águas salinas, uma vez que eles apresentam um amplo tempo de sobrevivência e maior resistência quando comparados à *Escherichia coli* e aos coliformes termotolerantes (Dufour, 1994).

Embora os programas de monitoramento das águas recreacionais marinhas já tenham sido implantados em vários estados brasileiros com sucesso, pouca atenção tem sido dada às areias das praias, que 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).

Os sedimentos devem receber atenção especial, uma vez que atuam como filtros que concentram vários tipos de poluentes, deixando-os armazenados. Alguns trabalhos já vêm demonstrando que as concentrações bacterianas encontradas nas areias têm sido superiores às encontradas na coluna de água (Andrade *et al.*, 2015). Esse fato pode ocorrer, uma vez que as bactérias podem sobreviver por mais tempo nesse ambiente (Whitman & Nevers, 2003), por encontrarem condições favoráveis de nutrientes (Brunke & Fischer, 1999), proteção contra os raios solares (Davies-Colley *et al.*, 1999) e contra a predação por protozoários (Davies & Bavor, 2000).

A movimentação de barcos, condições de marés, dragagens, ação das ondas, ressuspensão de areias e/ou sedimentos contribuem significativamente para que as bactérias contidas nas areias sejam liberadas para a coluna d'água, aumentando as concentrações de bactérias na água (AN *et al.*, 2002; Crabill *et al.*, 1999). A quantificação de organismos indicadores de contaminação nas areias recreacionais são de grande importância para verificar o risco da presença de microrganismos patogênicos (Cabelli *et al.*, 1982).

Mendes *et al.*, 1993, a fim de contribuir para pesquisas com a contaminação das areias de praias, utilizaram como indicadores as bactérias *Escherichia coli*. Todavia, estudos mostram que as bactérias do gênero *Enterococcus* parecem se acumular mais na areia (Alm *et al.*, 2003). Assim sendo, as bactérias do gênero *Enterococcus* seriam ótimos indicadores de contaminação para esse tipo de ambiente.

A introdução de bactérias alóctones em águas costeiras marinhas, não só causam impacto direto sobre a qualidade da água e areias, como também acarretam efeitos sobre os

organismos que habitam esse ecossistema, inclusive aqueles que possuem interesse comercial para consumo humano (Otway, 1995).

Do ponto de vista de saúde pública é importante considerar não apenas a possibilidade da transmissão de doenças de veiculação hídrica aos banhistas, mas, também a contaminação dos alimentos retirados do mar, uma vez que eles podem ser consumidos crus ou parcialmente cozidos. Logo a qualidade sanitária da água do mar e de organismos utilizados como fonte de alimento para humanos são extremamente importantes uma vez que a ingestão de alimentos e/ou águas contaminadas por microrganismos patogênicos são importantes causas da ocorrência de doenças diarreicas no Brasil (Brasil, 1999) como discutem vários pesquisadores (Instituto Adolfo Lutz, 2004). Tais doenças representam uma perda econômica significativa para o país e prejuízos para a saúde da população.

No caso dos moluscos bivalves, este fato é especialmente importante, uma vez que, ao filtrarem a água para obtenção de alimento e oxigênio, concentram em seus tecidos todo material em suspensão, inclusive as bactérias patogênicas (Vieira, 2004). Assim, a contaminação de águas onde moluscos bivalves são retirados para consumo ou cultivados pode ser um sério risco a saúde humana (Munn, 2004). Por esta razão, mexilhões e ostras, são utilizados mundialmente como organismos indicadores de poluição fecal (Henriques et al., 2000).

Os moluscos bivalves, como os mexilhões são organismos micrófagos que se alimentam de microrganismos e partículas orgânicas em suspensão na água (Ruppert et al., 2005). Estes organismos formam um aglomerado na zona entremarés de costões rochosos e têm importância econômica e como fonte de proteína para as populações caiçaras. Além disto, a prática de mitilicultura no litoral brasileiro é crescente, constituindo uma atividade econômica adicional para muitas cidades costeiras (Abessa et al., 2005).

As doenças de maior incidência são aquelas do trato gastrointestinal, associadas à natação e ao consumo de peixes e frutos do mar contaminados. Podem ocorrer desde infecções mais graves, como gastroenterites, hepatite A, cólera e febre tifóide, até outras causadas por patógenos oportunistas (Who, 1998).

Os padrões microbiológicos da qualidade de alimentos inclusive de origem marinha, tais como peixes, moluscos e crustáceos são regulamentadas pela Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução ANVISA RDC nº 12/01, baseando-se nas densidades de Coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella sp* (ANVISA, 2001).

O gênero *Aeromonas* é formado por microrganismos que apresentam oxidase e catalase positivas, anaeróbias facultativas, geralmente móveis devido à presença de flagelo, gram negativas, fermentadoras de glicose.

Essas bactérias não fazem parte do monitoramento da qualidade de praias previsto pela legislação CONAMA 274/2000 nem dos padrões microbiológicos da qualidade de alimentos, porém alguns estudos vem apontando que os peixes têm sido um importante veículo de infecções humanas causadas por esse gênero de bactéria, principalmente quando são ingeridos crus ou após tratamento térmico brando (Silva, 2010). As *Aeromonas* estão associadas a infecções oportunistas, tanto no ser humano como nos animais homeotérmicos e em peixes, tendo capacidade de apresentar resistência a múltiplas drogas (Palu et al., 2006).

Aeromonas sp são capazes de causar doenças em diversas espécies de peixes, anfíbios, bem como nos seres humanos que podem adquirir as infecções através de feridas abertas ou pela ingestão de alimento ou água infectadas por essa bactéria (FDA, 2009). No Brasil, as bactérias desse gênero são descritas como patógenos emergentes de importância crescente em alimentos (Lewis; Pumb, 1979).

As bactérias da espécie *Escherichia coli*, são caracterizadas por células em forma de bastonetes, com presença de flagelo, não esporulados, gram negativa e anaeróbia facultativa. É um habitante normal do intestino humano e de outros animais, que em determinadas situações, como pessoas debilitadas e imunossuprimidas podem causar infecções (Drasar; Hill, 1974).

Muitas infecções podem ser causadas por essa espécie. Tôres (2004) ainda afirma que a *Escherichia coli* é uma bactéria do grupo dos coliformes termotolerantes e a principal causadora de doenças diarreicas via ingestão de água e alimentos contaminados.

Os microrganismos do gênero *Enterococcus* são bactérias gram positivas, que se apresentam em forma de cocos, aeróbios facultativos, catalase negativa e fermentadores de glicose.

Enterococcus são típicos patógenos oportunistas, constituindo a terceira causa de infecções adquiridas no ambiente hospitalar (Euzéby, 2011). As infecções por essas bactérias podem se originar da microbiota normal do ser humano, da transferência de microrganismo de pessoa para pessoa ou do ambiente para a pessoa e pela aquisição dos patógenos através do consumo de água ou alimentos contaminados.

Além de serem fontes potenciais de contaminação humana por patógenos, os organismos filtradores que são cultivados em águas contaminadas, podem também contribuir para a disseminação de microrganismos resistentes a substâncias antimicrobianas, tais como antibióticos utilizados no tratamento de inúmeras doenças.

Um estudo realizado pelo National Research Council Committee on Drug Use in Food Animals (1999), relatou que o uso de antibióticos na terapêutica animal ou como promotores de crescimento elevaram as chances de desenvolvimento de resistência antimicrobiana e sua transferência a patógenos que causa doenças ao homem, causando um sério problema de saúde pública.

O uso massivo e descontrolado de antibióticos leva à 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).

A resistência bacteriana também pode ser de origem não genética, ou seja, fenotípica, o microrganismo adquire resistência a determinada droga, momentaneamente, e não consegue transmiti-la. Esse mecanismo geralmente está relacionado a processos de multiplicação bacteriana necessários para a combater as ações antibacterianas das drogas (Jawetz et al., 1991).

Águas marinhas que recebem esgoto doméstico podem contribuir para a disseminação de microrganismos carregados com genes de resistência antimicrobiana (Meirelles-Pereira et al., 2002), e também, podem adquirir resistência através do plasmídeo (Huycke et al., 1998) por conjugação.

Recentemente, infecções causadas por *Enterococcus sp* tornaram-se um grande desafio para seu tratamento, devido ao aumento da variabilidade de cepas resistentes (Arvanitidou et al., 2001). Os fenótipos mais importantes de resistência estão relacionados aos aminoglicosídeos (estreptomicina e gentamicina) aos betalactâmicos (amoxicilina e ampicilina) e glicopeptídeos (teicoplanina e vancomicina) (D'Ázevedo et al., 2004).

Deve ser dada muita atenção à problemática da resistência bacteriana, uma vez que os genes de resistência podem ser disseminados para bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes (Kuhn et al., 2000). Essa resistência também pode ser transferida por

microrganismos de uma mesma população ou de populações diferentes (Nijsten et al, 1993).

Dessa maneira a hipótese desse trabalho é que a região potencialmente mais poluída apresente maiores densidades de microrganismos e portanto maior percentual de resistência aos antibióticos testados.

2.0 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivos relacionar o grau de contaminação orgânica por esgoto doméstico em água, sedimento e mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), coletados nos municípios de Santos e Itanhaém (SP), com a diversidade e densidades de espécies de bactérias indicadoras de contaminação de origem fecal (*Enterococcus sp*, *Escherichia coli* e *Aeromonas sp*) e com seus padrões de resistência a antimicrobianos comumente utilizados para tratamento de infecções.

3.0 Metodologia

A área de estudo está localizada no litoral sul do estado de São Paulo, nos municípios de Santos e Itanhaém (figura 2), ambos estão localizados na Baixada Santista. Em Santos as coletas foram realizadas na ilha de Urubuqueçaba, potencialmente impactada, a ilha está situada dentro da Baía de Santos, próximo ao emissário submarino, local abrigado da ação das ondas e um dos pontos do litoral paulista mais sujeito a contaminação bacteriológica (Henriques et al., 2000) . Já em Itanhaém, as amostras foram coletadas no Costão dos Sonhos, localizado na praia dos Sonhos, uma região aberta, com forte influencia das ondas, sendo assim uma região potencialmente menos impactada.



Figura 2. Locais de coleta: Santos e Itanhaém, respectivamente (Google, 2016).

O município de Santos apresenta uma elevada concentração demográfica, sendo a cidade mais populosa da Baixada Santista segundo IBGE, 2015. O município é considerado um ponto turístico, muito frequentado por moradores da capital paulista e seus arredores, principalmente nos meses de verão. Porém as praias dessa região encontram-se contaminadas por substâncias diversas, gerando problemas ambientais e de saúde pública.

Em Santos também está localizado o Porto de Santos, um dos maiores do Brasil que movimenta muito da nossa economia. Ocorre que, com isso aumenta ainda mais a degradação desse ambiente, pois com a contaminação depositada nos sedimentos do fundo é constantemente revolvida pelo processo de dragagem. Esses resíduos antropogênicos muitas vezes são lançados nas regiões costeiras (Abessa et.al, 2012), comprometendo a qualidade desse ambiente.

Segundo a Cetesb 2015, todas as praias desta região tiveram aumento significativo no percentual de classificação Imprópria, sendo que na classificação anual foi apresentada como péssima, indicando queda na qualidade da água dessas praias. Segundo os critérios da OMS (Organização Mundial da Saúde), que associa a concentração de *Enterococcus* ao risco de contrair doenças, a classificação geral do município foi regular no último ano.

O município de Itanhaém apresentou suas praias próprias para banho em mais 80% do tempo no ano de 2015, sendo que a praia dos Sonhos, nosso local de amostragem,

se mostrou 95% do tempo como próprias, revelando assim uma melhor qualidade ambiental, comparado ao município de Santos, (Cetesb, 2015).

Foi realizado uma coleta durante o verão de 2016, período no qual as áreas costeiras sofrem um maior impacto. As amostras de água foram coletadas durante a maré baixa, em frascos estéreis, na isobata de 1 metro. Os exemplares de moluscos da espécie predominante nos costões selecionados, foram coletados através da raspagem de uma área dos costões rochosos com o uso de uma faca estéril. Os animais coletados foram armazenados em sacos estéreis. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento do processamento.



Figura 3. Mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), em seu ambiente natural (Foto tirada em Itanhaém 2016).

O sedimento foi coletado em cada ponto com auxílio de uma pá estéril e acondicionados em sacos estéreis. Foi considerado um transecto paralelo à linha costeira com três pontos equidistante de coleta de areia para constituir uma amostra composta. As amostras coletadas foram transportadas em bolsas térmicas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Experimental do Litoral Paulista – Unidade São Vicente, onde foram analisadas.

3.1 Determinação da densidade de *Enterococcus* sp

3.1.1. Água

As determinações das densidades bacterianas na água do mar foram feitas através da técnica de membrana filtrante (APHA, 2012). Foi filtrado um volume de 100 mL da amostra em membrana de 0,45 μm de porosidade. Após a filtração, as membranas foram depositadas em placas contendo meio de cultura Agar mEnterococcus. As placas de Agar

mEnterococos foram incubadas em estufa bacteriológica da marca Binder a 37°C por 24/48h. Após este período, as colônias de coloração vermelho-marrom foram contadas como *Enterococcus*. As densidades médias das colônias de bactérias do grupo *Enterococcus* isoladas da água foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias por 100mL (UFC 100 mL⁻¹) para água do mar. Com o auxílio de alça de platina estéril, algumas colônias consideradas nas contagens e escolhidas aleatoriamente, nas amostras de água e foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio Enterococcosel Caldo (Becton Dickinson Laboratories) e incubadas a 37°C por 24/48h. Os tubos que apresentarem 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 para a realização de testes bioquímicos e de suscetibilidade a antimicrobianos.



Figura 4. Kit de filtração utilizado para realizar a técnica de membrana filtrante (Micromar, 2016).

3.1.2 Mexilhões

As densidades de bactérias nos tecidos moles de mexilhão coletados foram obtidas pelo método de Membrana Filtrante à semelhança dos procedimentos realizados para as amostras de água. Para a extração das bactérias foram utilizados 20g dos tecidos

moles dos mexilhões acrescidos de 180ml de água homogeneizados em liquidificador por cerca de 10 minutos. A partir do sobrenadante da diluição 10^{-1} das amostras o molusco processadas para análise das densidades de coliformes, volumes de 1 e 5 mL foram filtrados em membrana filtrante 0,45 μm de porosidade. Estas foram transferidas para placas contendo meio de cultura Agar mEnterococcus, as quais foram incubadas a 37°C por 24/48 horas. Após o período de incubação foram contadas como *Enterococcus* sp as colônias de coloração vermelho-marrom. A confirmação do gênero *Enterococcus* foi feita, por amostragem, através da repicagem das colônias em meio Enterococosele caldo. Os resultados das densidades de *Enterococcus* sp. nas amostras dos moluscos serão expressos como Unidades Formadoras de Colônias em 1g (UFC g^{-1}). Dessas colônias algumas serão escolhidas para realização dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

3.1.3 Areia/Sedimento

As amostras de areia foram pesadas em balança analítica e 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, 2012). Volumes de 10 mL e 50 mL do sobrenadante foram filtrados em membranas de 0,45 μm de porosidade. Após a filtração, as membranas foram depositadas em placas contendo meio de cultura Agar mEnterococcus. Essas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48h. Após este período, as colônias de coloração vermelho-marrom foram contadas como *Enterococcus*. Dessas colônias algumas serão escolhidas para realização dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

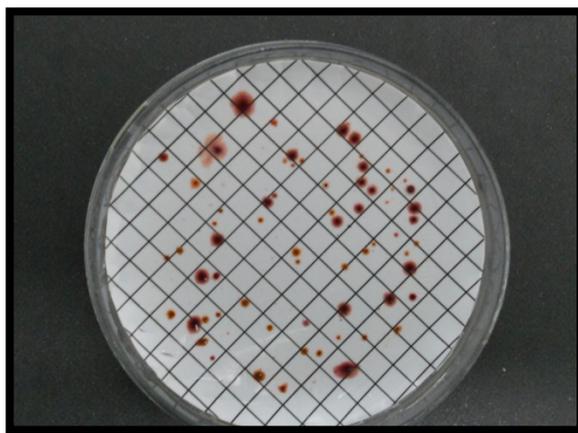


Figura 5. Placa de Agar mEnterococcus com colônias de *Enterococcus* sp (Micromar, 2016)

3.2 Determinação da densidade de *Escherichia coli*

3.2.1 Água

Para a determinação da densidade de *Escherichia coli* também foi utilizada a técnica de Membrana Filtrante (APHA, 2012). Volumes de 100 mL das amostras de água foram filtrados em membranas de 0,45 μ m de porosidade e foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Agar mTEC. Estas foram incubadas a 37°C por 2h e em seguida a 44°C por 24h em banho-maria. Após o período de incubação as colônias de coloração amarela foram consideradas *E. coli*. Dessas colônias algumas foram escolhidas para realização dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

3.2.2. Mexilhões

As densidades de *E. coli* nos tecidos moles de mexilhão coletados foram obtidas pelo método de Membrana Filtrante à semelhança dos procedimentos realizados para as amostras de água. A partir do sobrenadante da diluição 10^{-1} das amostras o molusco processadas para análise das densidades, volumes de 1 e 5 mL foram filtrados em membrana filtrante 0,45 μ m de porosidade. Estas foram transferidas para placas contendo meio de cultura Agar mTEC. Estas foram incubadas a 37°C por 2h e em seguida a 44°C por 24h em banho-maria. Após o período de incubação as colônias de coloração amarela foram consideradas *E. coli*. Dessas colônias algumas foram escolhidas aleatoriamente para realização dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

3.2.3 Areia/Sedimento

As amostras de areia foram pesadas em balança analítica e acondicionadas em *erlenmeyers*, acrescidas de água destilada estéril (1:10) e submetidas a agitação em um agitador por cerca de 10 minutos, para lavagem e extração das bactérias da areia e obtenção do sobrenadante. A determinação das densidades de bactérias no sobrenadante foram feitas através da técnica de membrana filtrante (APHA, 2012). Volumes de 10mL e 50mL 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 mTec. Estas foram incubadas a 37°C por 2h e em seguida a 44°C por 24h em banho-maria. Após o período de incubação as colônias de coloração amarela serão consideradas *E. coli*. Dessas colônias algumas serão escolhidas para realização dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

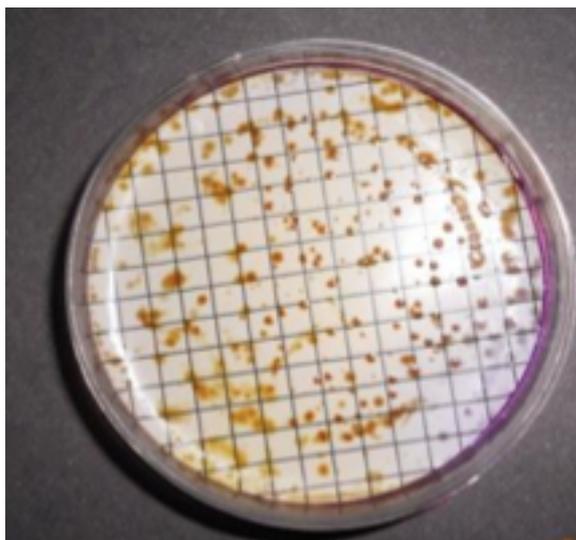


Figura 6. Placa de Agar mTec com colônias de *Escherichia coli* (Micromar, 2016)

3.3 Determinação da densidade de *Aeromonas sp*

3.3.1 Água

Para determinar as densidades de *Aeromonas sp*, foi utilizada a técnica de membrana filtrante (APHA, 2012). Volumes de 100mL das amostras de água foram filtrados em membranas de 0,45 µm de porosidade e foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Agar MacConkey. Estas foram incubadas a 35°C por 24h. As placas que apresentarem colônias típicas, isto é, diâmetro de 2 e 3 mm, brilhantes e convexas, foram isoladas, para posterior teste de identificação . Após a confirmação das

colônias positivas, essas foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio Agar Müller-Hinton inclinado para a realização de testes bioquímicos e de suscetibilidade a antimicrobianos.

3.3.2 Mexilhões

As densidades nos tecidos moles de mexilhão coletados foram obtidas pelo método de Membrana Filtrante à semelhança dos procedimentos realizados para as amostras de água. A partir do sobrenadante da diluição 10^{-1} das amostras do molusco processadas para análise das densidades, volumes de 1 e 5 mL foram filtrados em membrana filtrante 0,45 μm de porosidade. Estas foram transferidas para placas contendo meio de cultura Ágar MacConkey. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. As placas que apresentarem colônias típicas, isto é, diâmetro de 2 e 3 mm, brilhantes e convexas. Dessas colônias algumas foram selecionadas para realização dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

3.3.3 Areia/Sedimento

As amostras de areia foram pesadas em balança analítica e acondicionadas em *erlenmeyers*, acrescidas de água destilada estéril (1:10) e submetidas a 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, 2012). Volumes de 10 mL e 50 mL do sobrenadante foram filtrados em membranas de 0,45 μm de porosidade. Após a filtração, as membranas foram depositadas em placas contendo meio de cultura Agar MacConkey. Estas foram incubadas a 35°C por 24 horas. As placas que apresentarem colônias típicas, isto é, diâmetro de 2 e 3 mm, brilhantes e convexas. Dessas colônias algumas foram selecionadas para realização dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

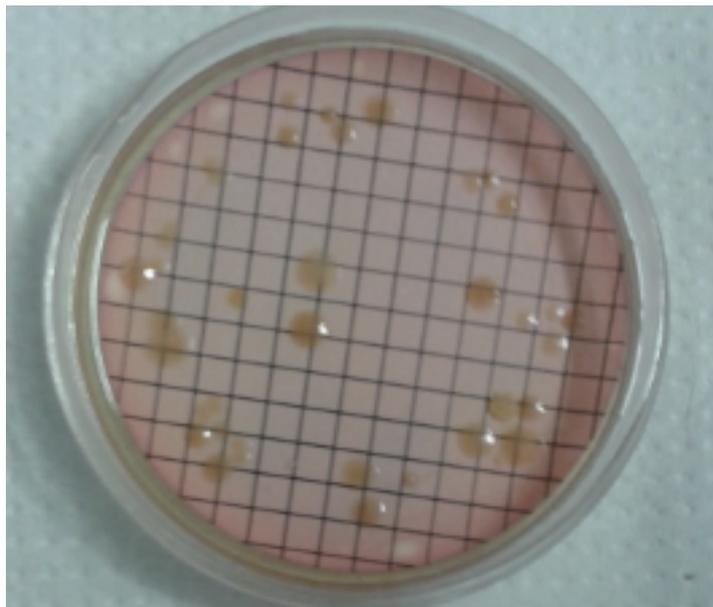


Figura 7. Placa de Agar MacConkey com colônias de *Aeromonas sp* (Micromar, 2016)

3.4 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

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, 2010) utilizando o Agar Müller-Hinton.

As colônias bacterianas isoladas foram testadas frente aos antibióticos como segue: *Enterococcus sp* ampicilina 10 μ g, ciprofloxacina 5 μ g, eritromicina 15 μ g, gentamicina 10 μ g, vancomicina 30 μ g, penicilina 10 μ g e estreptomicina 10 μ g. *Escherichia coli* foram submetidas aos seguintes antimicrobianos: eritromicina 15 μ g, amoxicilina + ácido clavulânico 30 μ g, vancomicina 30 μ g, ciprofloxacina 5 μ g, levofloxacina 5 μ g, norfloxacina 10 μ g e fosfomicina 200 μ g. *Aeromonas sp* foram submetidas aos seguintes antimicrobianos: norfloxacina 10 μ g, ciprofloxacina 5 μ g, gentamicina 10 μ g, cefalotina 30 μ g, tetraciclina 30 μ g, cefuroxima 30 μ g e Ceftriaxona 30 μ g.



Figura 8. Frascos contendo discos impregnados por antibióticos, no caso a Estreptomicina, representando os discos utilizados nos testes (Micromar, 2016).

Das culturas mantidas em BHI inclinado, algumas foram escolhidas aleatoriamente e transferidas, com o auxílio de uma alça de platina estéril, para tubos contendo 10mL de água destilada estéril, em quantidade suficiente de inóculo até atingir o grau de turvação 0,5, comparativamente a tubo padronizado de acordo com a escala de MacFarland (Bier, 1994).

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.

Os inóculos foram preparados imediatamente antes do início de cada teste. Após o ajustamento de sua turbidez, foi introduzido 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 Müller-Hinton foi inoculada esfregando o *swab* em toda a superfície estéril do ágar, 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 haver 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 24mm. 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 um paquímetro (Mitutoyo), incluindo o diâmetro do disco.

A medição foi realizada encostando-se o paquímetro 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.

De acordo com os diâmetros encontrados, estabelecemos o grau de suscetibilidade das bactérias aos antimicrobianos testados, verificando se os organismos são sensíveis, intermediários ou resistentes.

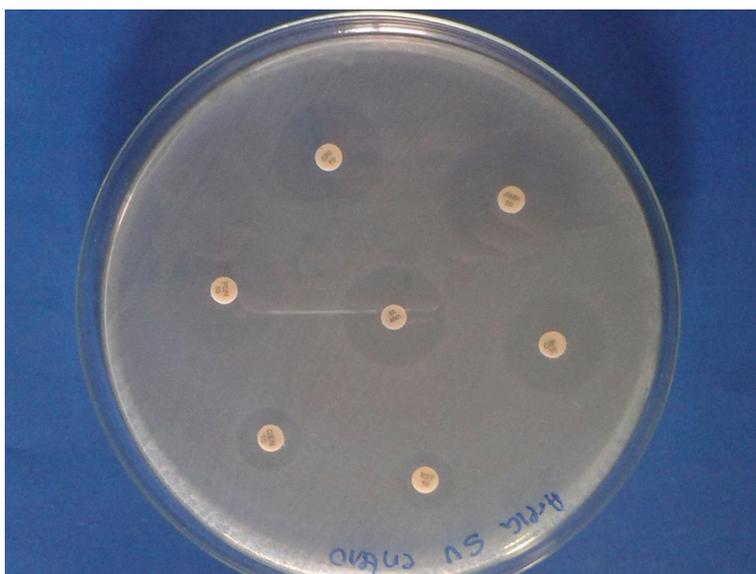


Figura 9. Placa de Agar Müller-Hinton com teste de resistência a antimicrobianos (Micromar, 2016)

4.0 Resultados e Discussão

4.1 Densidades

Os valores médios das densidades de *Enterococcus sp*, *E. coli* e *Aeromonas sp*, obtidos para as amostras de água, sedimento e mexilhão, coletadas na Ilha de Urubuqueçaba (Santos) e no Costão dos Sonhos (Itanhaém) são apresentados na Tabela 1. Na tabela 1 é possível observar que as densidades de *Enterococcus sp* nas águas, sedimentos e mexilhões coletados em Santos foram superiores àquelas obtidas para Itanhaém. Entretanto, o mesmo não foi observado para *E. coli* e para *Aeromonas sp*, fato que pode ser explicado por se tratar de um ambiente salobro, no qual os *Enterococcus* sabidamente (Dufour, 1994) sobrevivem por mais tempo por estarem mais adaptados às condições de salinidade. Além disto não se pode descartar a possibilidade da presença de fontes difusas de contaminação próximo ao local de coleta no município de Itanhaém.

Tabela 1. Densidade de *Enterococcus sp*, *Escherichia coli* e *Aeromonas sp* isolados da água (UFC 100mL⁻¹), sedimento e tecido moles de mexilhão (UFC g⁻¹), coletados nos municípios de Santos e Itanhaém.

		<i>Enterococcus sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aeromonas sp</i>
	Água(UFC 100mL ⁻¹)	212	2	28
Santos	Sedimento (UFC g ⁻¹)	2354	109	2008
	Mexilhão (UFC g ⁻¹)	18181	5090	8318
	Água(UFC 100mL ⁻¹)	164	76	170
Itanhaém	Sedimento (UFC g ⁻¹)	90	209	6536
	Mexilhão (UFC g ⁻¹)	13272	1363	818

As amostras de água coletadas na Ilha de Urubuqueçaba (Santos), apresentaram densidades médias de 212 UFC 100mL⁻¹ de *Enterococcus sp*, enquanto que nas amostras de sedimento e de mexilhão os valores obtidos são bem superiores, de 2.354 UFC g⁻¹ e de 18.181 UFC g⁻¹ respectivamente.

Em relação às densidades de *Escherichia coli* os maiores valores foram obtidos nas amostras de sedimento e mexilhão. O valor médio na água de 2 UFC 100mL⁻¹, enquanto que no sedimento e nos mexilhões as densidades foram de 109 UFC g⁻¹ e de 5.090 UFC g⁻¹ respectivamente.

As densidades médias de *Aeromonas sp* também foram maiores no sedimento e nas amostras de mexilhão, comparativamente à média obtida para as amostras de água. Para água foram encontrados 28 UFC 100mL⁻¹, para o sedimento 2.008 UFC g⁻¹ e os tecidos dos mexilhões apresentando a maior densidade 8.318 UFC g⁻¹.

Em Itanhaém, na água coletada das adjacências do Costão dos Sonhos, a densidade média de *Enterococcus sp* foi de 164 UFC 100mL⁻¹ de água, enquanto que no sedimento o valor obtido foi de 90 UFC g⁻¹ e nos mexilhões de 13.272 UFC g⁻¹ (Tabela 1).

Para *Escherichia coli* foram encontrados 76 UFC 100mL⁻¹ de água, 290 UFC g⁻¹ de sedimento e 1.363 UFC g⁻¹ de tecido de mexilhão. Para *Aeromonas sp*, encontramos uma média de 170 UFC 100mL⁻¹ para água, 6.536 UFC g⁻¹ para sedimento e de 818 UFC g⁻¹ para os tecidos dos mexilhões (Tabela 1).

Segundo a resolução CONAMA n° 274, de 29 de novembro de 2000, é considerada própria para banho a praia que apresentar densidade de *Enterococcus* até 400 UFC 100mL⁻¹, 2.500 UFC 100mL⁻¹ de coliformes fecais (termotolerantes), ou, ainda, 2.000 UFC 100mL⁻¹ de *Escherichia coli* em uma única amostra. Ou quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver no máximo 1.000 coliformes fecais (termotolerantes) ou 800 *Escherichia coli* ou 100 *Enterococcus* por 100 mililitros.

Os resultados obtidos no presente estudo apontam que as águas coletadas na Ilha de Urubuqueçaba e no Costão dos Sonhos, estão próprias para banho. O resultado obtido para Santos contradiz os relatórios da Cetesb, que indica o ponto como impróprio a maior parte do tempo. Já no Costão dos Sonhos, esses resultados são corroborados.

Para os valores obtidos para sedimento e tecidos moles de mexilhão observam-se valores elevados, comprovando que as areias e os organismos filtradores concentram maiores densidades de microrganismos quando comparado com a coluna de água, causando uma contaminação crônica. Elmanama *et al*, 2005, obtiveram resultados semelhantes para as praias de Gaza, assim como Bonilla *et al*, 2007, encontraram densidades de bactérias de 2 a 23 vezes maiores que na coluna de água, em estudos realizados na Flórida.

Martinez *et al.* (2010) em seu estudo realizado em Santos e São Vicente também encontrou maiores densidades de *Enterococcus sp* nos mexilhões em relação a água, segundo ele os *P. Perna* apresentam um grande potencial para acumular bactérias devido a maneira de alimentar-se e apesar dessa capacidade a relação entre o número de bactérias na coluna da água e as bactérias acumuladas pelo mexilhão não é direta e depende de muitos fatores.

Pinto *et al.* (2012) e Pinhata *et al* (2008) também encontraram maiores densidades de *Enterococcus sp* nas areias do que na coluna da água em seus trabalhos realizados em Santos e São Vicente, corroborando os valores obtidos no presente estudo.

Segundo Davies – Colley *et al*, 1999, estudos têm demonstrado que indicadores fecais na água do mar sofrem inativação causada pelos raios solares e estão expostos à ação de bacteriófagos, baixa quantidade de nutrientes, predação e competição com organismos autóctones. Dessa forma, as areias de praias agiriam como protetoras para tais microrganismos. De fato, as areias de praia constituem um ambiente protetor possibilitando a sobrevivência dessas bactérias, pois elas podem se aderir a partículas do sedimento (Whitman; Nevers, 2003). Ainda, grandes quantidades de detritos orgânicos são encontrados aderidos no sedimento, possibilitando a sobrevivência dessas bactérias por longos períodos (Pinto *et al*, 2012).

Os resultados das densidades em água, sedimento e dos tecidos moles de mexilhão foram submetidas a correlação de Pearson. Houve correlação positiva as amostras de Santos entre água e o sedimento ($p= 0,62$) e negativa entre água e o mexilhão ($p= -0,25$). Já para as amostras de Itanhaém ocorreu o inverso, houve correlação negativa entre a água e o sedimento ($p= -0.21$) e positiva entre água e o mexilhão ($p= 0,1$).

4.2 Relações entre a densidade de microrganismos e sua resistência

As bactérias do gênero *Enterococcus sp* se mostraram melhores indicadores, uma vez que o grau de contaminação teve uma relação direta com a resistência aos antimicrobianos analisados. Pode se observar que as maiores densidades foram observadas nos tecidos dos mexilhões e esses também apresentaram as maiores porcentagens de resistência aos antimicrobianos analisados (Tabela 2).

As *Escherichia coli* e as *Aeromonas sp* já não apresentaram esse padrão. As *Escherichia coli* apresentaram um padrão de contaminação entre a água e o mexilhão,

porém a resistência aos antimicrobianos não acompanhou o grau de contaminação. Por fim, as *Aeromonas sp* não apresentaram relação entre as densidades e a resistência aos antimicrobianos (Tabela 2).

Tabela 2. Densidade e resistência de *Enterococcus sp*, *Escherichia coli* e *Aeromonas sp* isolados da água (UFC 100mL⁻¹), sedimento e tecido moles de mexilhão (UFC g⁻¹), coletados nos municípios de Santos e Itanhaém.

	<i>Enterococcus sp</i>	Resistentes	<i>E. coli</i>	Resistentes	<i>Aeromonas sp</i>	Resistentes	
		(%)		(%)		(%)	
	Água(UFC 100 mL ⁻¹)	212	61,9	2	21,4	28	56,7
Santos	Sedimento (UFC g ⁻¹)	2354	54	109	26,5	2008	23,8
	Mexilhão (UFC g ⁻¹)	18181	47	5090	0	8318	42,3
	Água(UFC 100 mL ⁻¹)	164	37,5	76	42,9	170	53
Itanhaém	Sedimento (UFC g ⁻¹)	90	14,2	209	12,9	6536	4,8
	Mexilhão (UFC g ⁻¹)	13272	57,1	1363	42,9	818	28,5

Smith *et al.* (2008) em seu trabalho com peixes também não encontrou um padrão de densidades e resistência aos antimicrobianos em *Aeromonas sp*, vindo de encontro com o presente estudo. Ele elucidou que as diferenças fisiológicas entre as espécies que habitam o ambiente aquático e esse ambiente são muito grandes interferindo na forma de ação dos antimicrobianos, necessitando de farmacocinéticas específicas.

4.3 Resistência a antimicrobianos de *Enterococcus sp*

O presente estudo apresentou 61,9% de cepas resistentes a antimicrobianos nas águas de Santos, enquanto a água de Itanhaém apresentou apenas 37,5% de resistência. O sedimento de Santos apresentou 54% de resistência, enquanto o de Itanhaém tem seu menor percentual, com apenas 14,2% de cepas resistentes. Para os tecidos do mexilhão, em

ambos os pontos a resistência foi parecida com 47% e 57,1% em Santos e Itanhaém, respectivamente (figura 10).

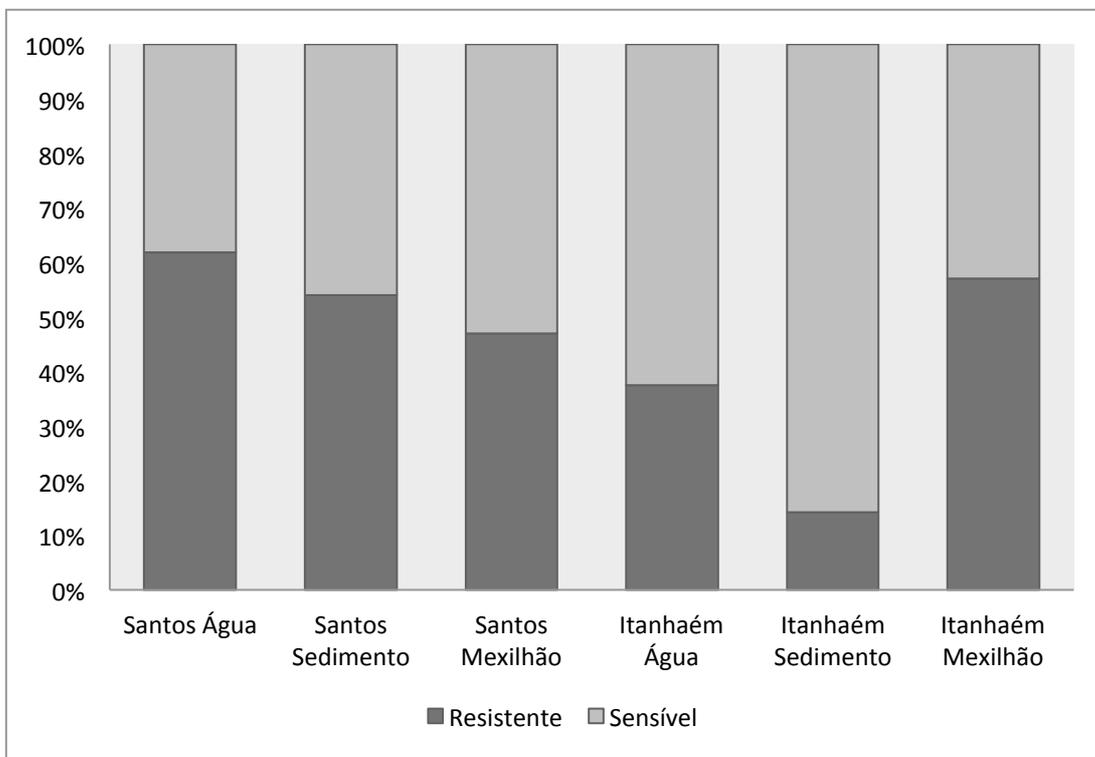


Figura 10. Porcentagem de *Enterococcus sp* resistentes a antimicrobianos isolados de água, sedimento e tecidos moles de mexilhão coletados em Santos e Itanhaém

O uso massivo e descontrolado dos antibióticos em diferentes ambientes gerou como consequência a seleção de bactérias resistentes. Essa resistência é resultado de um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos nos microrganismos que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas, ou também ocorre a transferência dos genes de resistência, através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em plasmídeos e transposons (Tavares, 2000), transferindo assim genes de resistência a um ou mais antibióticos.

As cepas analisadas nesse trabalho apresentaram resistência múltipla aos antimicrobianos, como observado na água de Santos (22,2% das cepas resistentes a seis antimicrobianos e 44,4% resistentes a quatro). O sedimento coletado em Santos também apresentou 40% de suas cepas resistentes a seis antibióticos. Essa resistência a

antimicrobianos tem gerado problemas de saúde pública, uma vez que os medicamentos mais utilizados para tratamento da população vêm se mostrando ineficaz.

O mexilhão, um organismo filtrador, utilizado como alimentação de base para muito ribeirinhos, também tem revelado esse problema, uma vez que esse trabalho apontou uma alta resistência a múltiplos antimicrobianos, chegando a 44,4% das cepas resistentes a cinco antibióticos nas amostras coletadas em Itanhaém (figura 11).

Estudo realizado por Cereda (2000), constatou múltipla resistência a dez antibióticos diferentes, inclusive a vancomicina, uma das drogas mais utilizadas para tratamento das cepas de *Enterococcus sp.* No presente estudo a vancomicina se mostrou eficaz, exceto para as cepas isoladas nas águas de Santos, onde houve resistência a 77% das amostras o que é um fato extremamente importante.

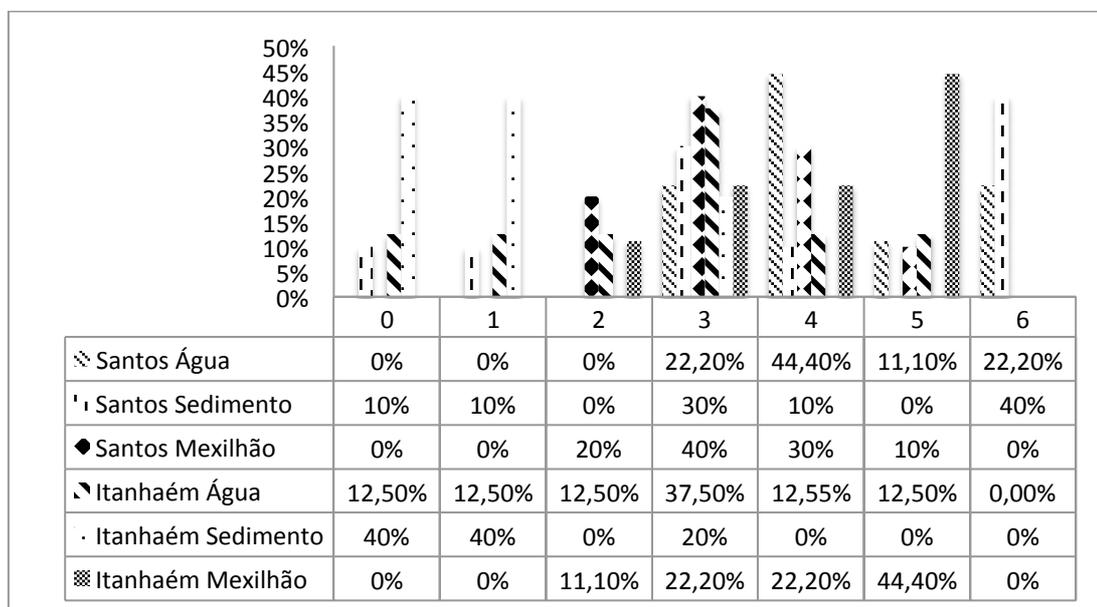


Figura 11. Porcentagem de cepas de *Enterococcus sp* isolados de água, sedimento e tecido moles de mexilhão, coletados em Santos e Itanhaém resistentes a múltiplos antimicrobianos.

A disseminação de bactérias resistentes é preocupante, pois elas podem estar em águas para consumo humano ou recreativas, no ar e em alimentos de origem animal e vegetal, como no caso dos mexilhões. A descarga de efluentes de esgotos hospitalares e urbanos deficientemente tratados e de resíduos de antibióticos por parte da indústria farmacêutica, o uso intensivo de antibióticos na produção animal e na aquicultura podem ser algumas das razões apontadas, que justificam a presença dessas bactérias resistentes nos alimentos, nos animais e na água (Silveira, 2009). Alguns trabalhos apontam grandes

quantidades de antibióticos como a ciprofloxacina (Silveira, 2009), tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas em águas superficiais em alguns países (Bila *et al*, 2003).

A preocupação com os antibióticos lançados no meio aquático está no fato de que eles resultam em um aumento da resistência das bactérias desse ambiente a estas substâncias, obtendo maior relevância se levarmos em consideração a ocorrência de bactérias patogênicas (Silva, 2003). Visto que os mexilhões são organismos filtradores, utilizados como alimento, essa preocupação é ainda maior, pois eles retêm todo tipo de partículas, inclusive essas cepas resistentes, disseminando até a população.

As amostras de água coletada em Santos apresentaram uma resistência de 100% a eritromicina, 88,8% a penicilina, 77,7% a vancomicina, se apresentando mais eficiente a ciprofloxacina, com apenas 11,1% de cepas resistentes (Figura 12). Já para água coletadas em Itanhaém, houve uma resistência de 75% em gentamicina, estreptomicina e eritromicina, como pode ser observado na figura 13.

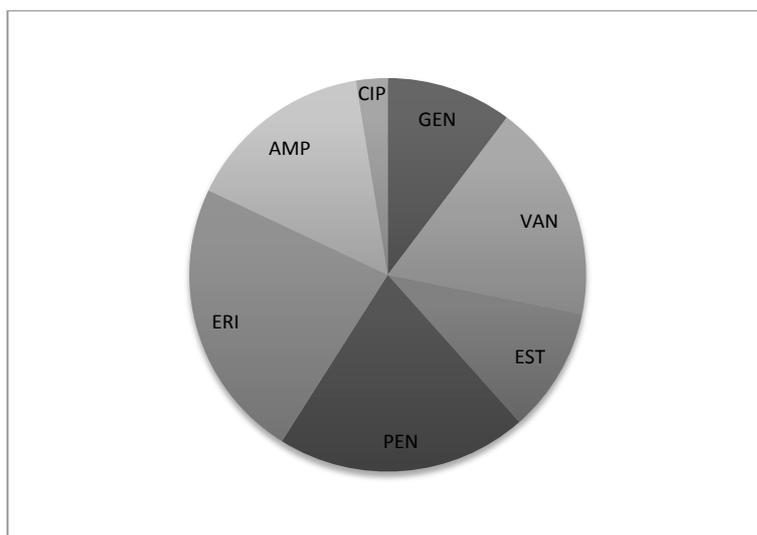


Figura 12. Porcentagem de cepas de *Enterococcus sp* isoladas da água coletadas em Santos, resistentes aos antimicrobianos testados, sendo CIP (ciprofloxacina – 11,1%), GEN (gentamicina – 44,4%), VAN (vancomicina – 77,7%), EST (estreptomicina 44,4%), PEN (penicilina – 88,8%), ERI (eritromicina – 100%) e AMP (ampicilina – 66,6%).

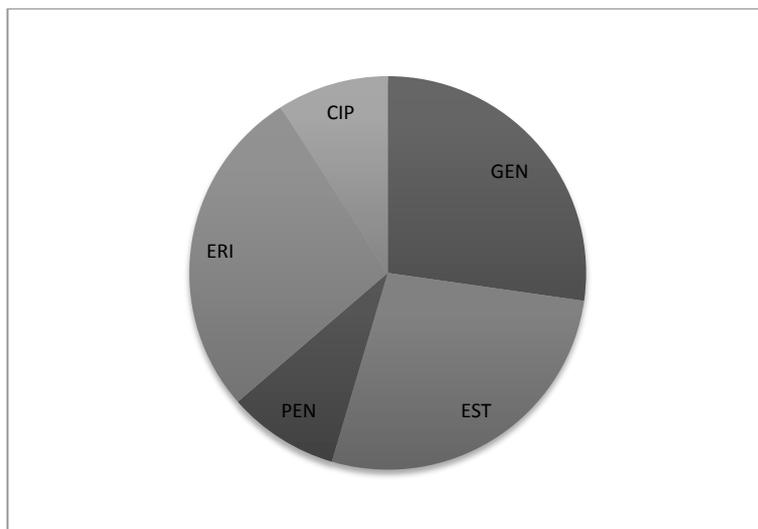


Figura 13. Porcentagem de cepas de *Enterococcus sp* isoladas da água coletadas em Itanhaém, resistentes aos antimicrobianos testados, sendo CIP (ciprofloxacina – 25%), GEN (gentamicina – 75%), EST (estreptomicina – 75%), PEN (penicilina – 25%) e ERI (eritromicina – 75%).

Para as cepas isoladas do sedimento de Santos, houve uma resistência de 90% a estreptomicina, de 80% a ciprofloxacina e gentamicina, o único antimicrobiano que se mostrou sensível foi a vancomicina (Figura 14). Para as cepas isoladas em Itanhaém, somente para estreptomicina houve resistência de 40%, para os demais antibióticos testados, houve sensibilidade de 80% ou mais (Figura 15).

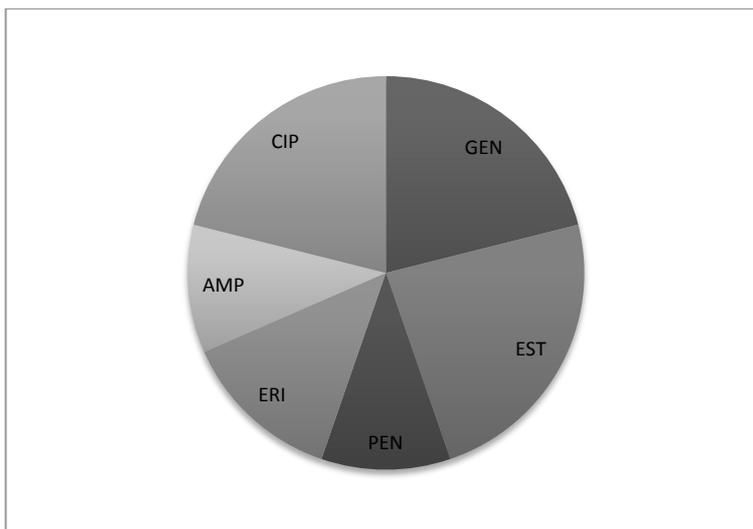


Figura 14. Porcentagem de cepas de *Enterococcus sp* isoladas do sedimento coletados em Santos, resistentes aos antimicrobianos testados, sendo CIP (ciprofloxacina – 80%), GEN (gentamicina – 80%), EST (estreptomicina – 90%), PEN (penicilina – 40%), ERI (eritromicina – 50%) e AMP (ampicilina – 40%).

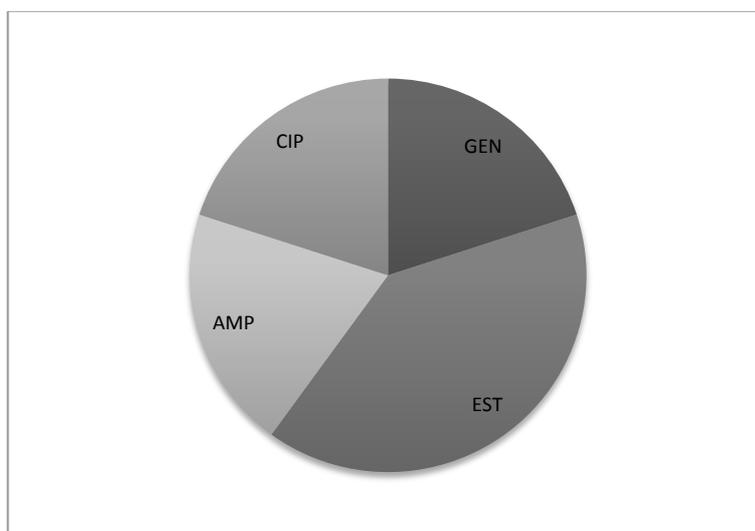


Figura 15. Porcentagem de cepas de *Enterococcus sp* isoladas do sedimento coletados em Itanhaém, resistentes aos antimicrobianos testados, sendo CIP (ciprofloxacina – 20%), GEN (gentamicina – 20%), EST (estreptomicina – 40%) e AMP (ampicilina – 20%).

Por fim, as cepas isoladas dos tecidos moles do mexilhão, 90% foram resistentes a eritromicina e 80% a gentamicina e estreptomicina (Figura16). Para os mexilhões coletados em Itanhaém, 100% das cepas foram resistentes a estreptomicina e eritromicina. A vancomicina se mostrou sensível para essa cepas (Figura 17).

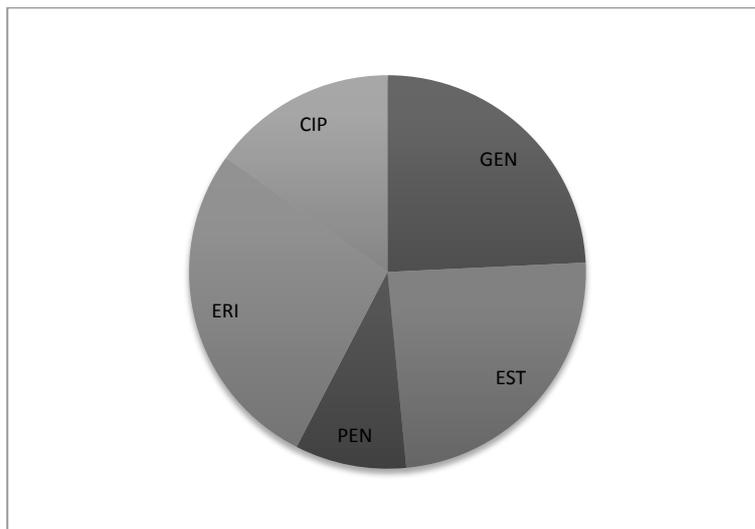


Figura 16. Porcentagem de cepas de *Enterococcus sp* isoladas dos tecidos moles de mexilhão coletados em Santos, resistentes aos antimicrobianos testados, sendo CIP (ciprofloxacina – 50%), GEN (gentamicina – 80%), EST (estreptomicina – 80%), PEN (penicilina – 30%) e ERI (eritromicina - 90%).

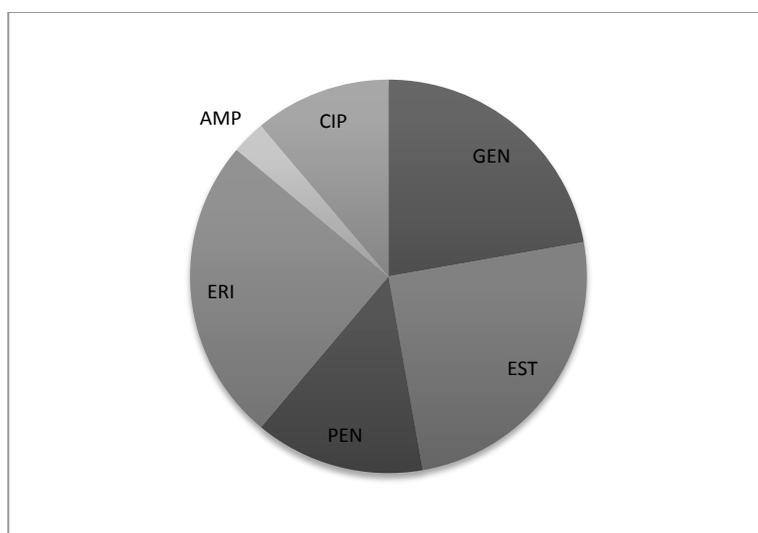


Figura 17. Porcentagem de cepas de *Enterococcus sp* isoladas dos tecidos moles de mexilhão coletados em Itanhaém, resistentes aos antimicrobianos testados, sendo CIP (ciprofloxacina – 44,4%), GEN (gentamicina – 88,8%), EST (estreptomicina – 100%), PEN (penicilina – 55,5%), ERI (eritromicina - 100%) e AMP (ampicilina – 11,1%).

Arvanitidou *et al* em 2001, relatou em seu trabalho a resistência à eritromicina em *Enterococcus sp*, vindo ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo. Um

trabalho de grande interesse, pois este é frequentemente utilizado em pacientes com suspeitas de alergia à penicilina. 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.

O trabalho de Pinhata, 2006, relatou a resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* isolados de areias e águas recreacionais marinhas, demonstrou que esse gênero de bactéria foi resistente à ampicilina, eritromicina, gentamicina, rifampicina e a vancomicina. Esses resultados vão ao encontro dos obtidos no presente estudo, exceto a vancomicina que houve sensibilidade para a maioria das cepas analisadas.

Enterococcus sp resistentes a vancomicina foram isolados em águas superficiais da Suécia e da Espanha por Kühn *et al.* (2000). Esses autores ressaltaram que a ocorrência 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)

Esse aumento de bactérias resistentes gera um problema de saúde pública, pois a maioria dos antibióticos utilizados em larga escala pela medicina acaba sendo ineficientes a infecções que antes eram de fácil tratamento e acabam por se tornar difíceis de tratar, podendo, inclusive, tornar-se fatais.

4.4 Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli*

As análises de resistência a antimicrobianos por *Escherichia coli* realizadas neste trabalho mostrou que 21,4% das cepas da água coletada em Santos foram resistentes, enquanto as de Itanhaém foram de 42,9%. Bactérias isoladas do sedimento de Santos apresentaram uma resistência de 26,5% e as isoladas em Itanhaém de apenas 12,9%. Para os tecidos moles de mexilhão coletados em Santos, os antimicrobianos se mostraram totalmente eficientes, com nenhuma porcentagem de resistência. O mesmo não acontece para mexilhões coletados em Itanhaém, onde as cepas de *Escherichia coli* foram resistentes a 42,9% dos antimicrobianos testados, (Figura 18).

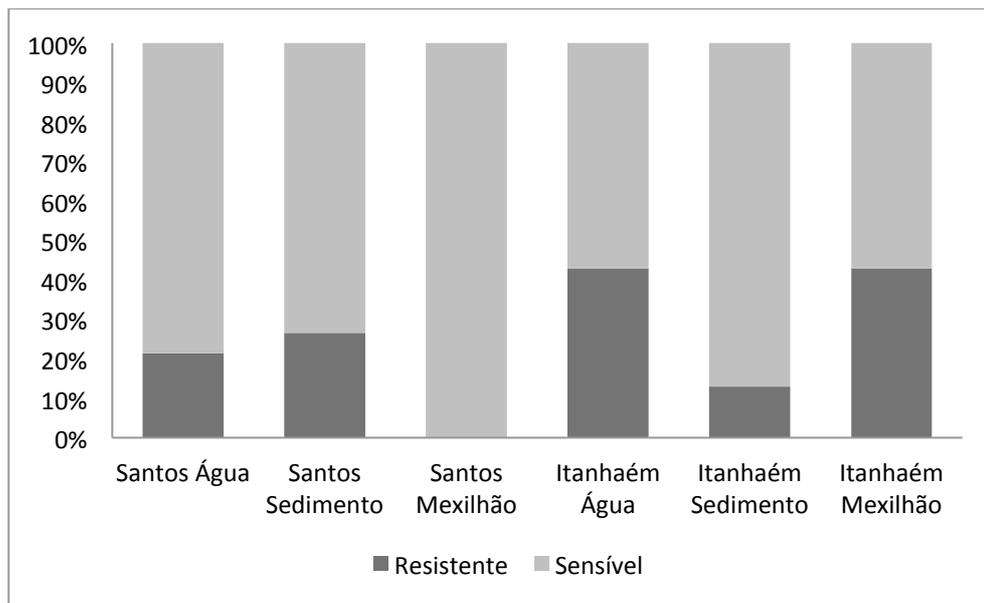


Figura 18. Porcentagem de *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos isolados de água, sedimento e tecidos moles de mexilhão coletados em Santos e Itanhaém

A múltipla resistência aos antibióticos é um problema sério para a saúde pública, interferindo no tratamento efetivo das infecções por esse agente, deixando poucas opções terapêuticas. O presente estudo mostra mais uma vez essa resistência múltipla, onde 10% das cepas do sedimento de Itanhaém foram resistentes a cinco antibióticos e 50% daquelas isoladas da água foram resistentes a quatro antibióticos, como pode ser visto na figura 19.

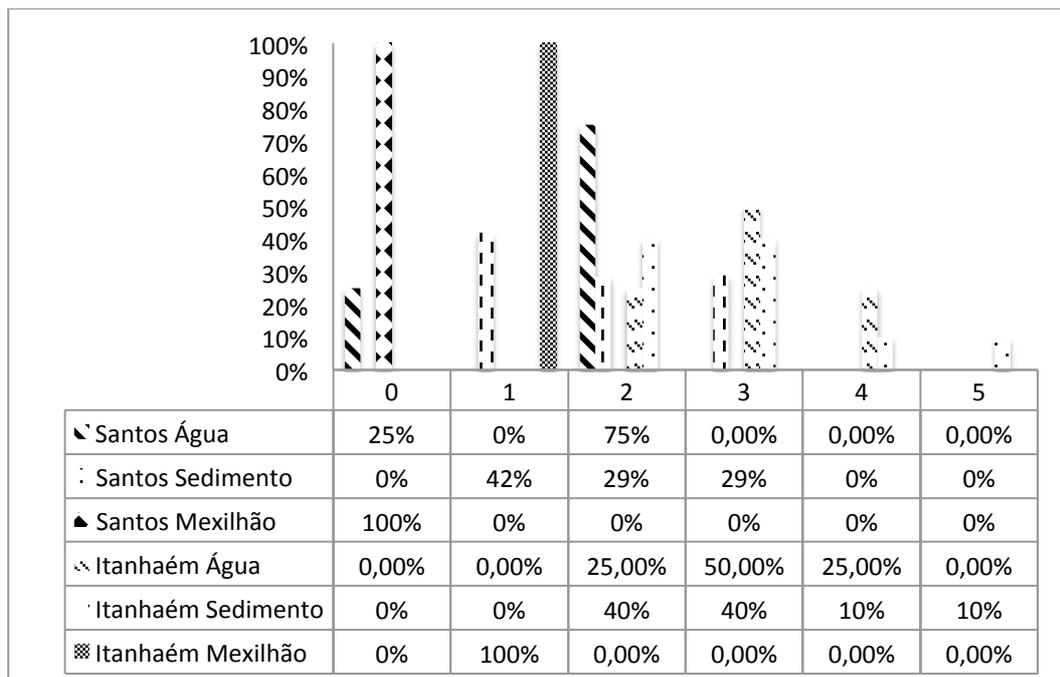


Figura 19. Porcentagem de cepas de *Escherichia coli* isolados de água, sedimento e tecido moles de mexilhão, coletados em Santos e Itanhaém resistentes a múltiplos antimicrobianos.

Análises de Schneider *et al.* (2009) ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água superficiais, mostraram que a frequência de resistência variou entre um e sete antimicrobianos, porém o maior número de isolados resistentes foi obtido para somente um antimicrobiano, esse trabalho vai de encontro com os resultados obtidos nesse estudo, onde também houve a múltipla resistência, variando de um a cinco antimicrobianos.

Von Baum e Marre (2005), também descreveram em seu trabalho que a resistência à pelo menos duas classe de antimicrobianos tem sido comum tanto na medicina veterinária quanto humana, restringindo as opções terapêuticas disponíveis.

As amostras de água coletadas em Santos apresentaram uma resistência de 75% a vancomicina e a eritromicina, se mostrando eficiente para os demais antibióticos testados (Figura 20). Já para água coletada em Itanhaém, houve resistência de 100% para vancomicina e eritromicina, de 50% para amoxicilina + ácido clavulânico, 37,5% das cepas foram resistentes a fosfomicina e por fim a ciprofloxacina se mostrando mais eficiente com apenas 12,5% de cepas resistentes, como pode ser observado na figura 21.

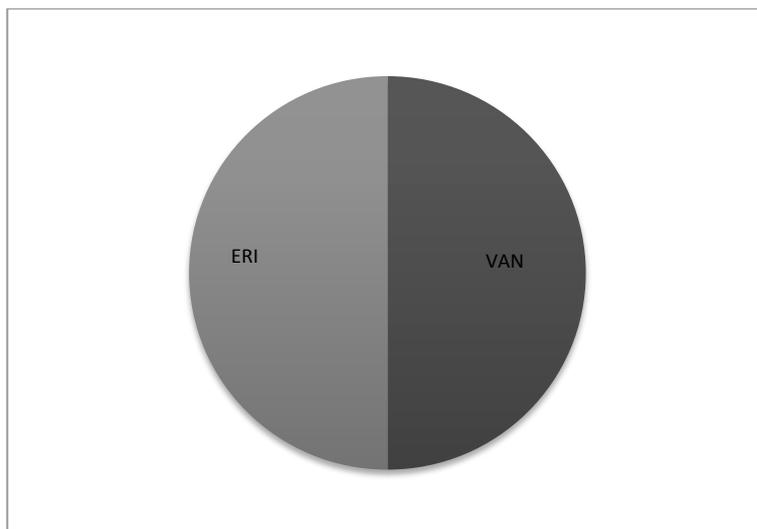


Figura 20. Porcentagem de cepas de *Escherichia coli* isoladas da água coletada em Santos, resistentes aos antimicrobianos testados sendo, VAN (vancomicina – 75%) e ERI (eritromicina – 75%).

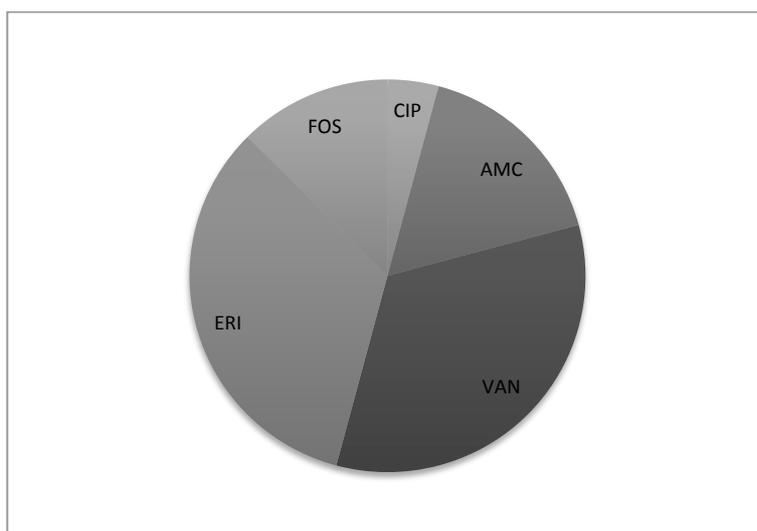


Figura 21. Porcentagem de cepas de *Escherichia coli* isoladas da água coletada em Itanhaém resistentes aos antimicrobianos testados, sendo CIP (ciprofloxacina – 12,5%), AMC (amoxicilina + ácido clavulânico – 50%)VAN (vancomicina – 100%), ERI (eritromicina – 100%) e FOS (fosfomicina – 37,5%)

Para as cepas isoladas do sedimento de Santos, houve uma resistência de 85% a vancomicina, de 43% a eritromicina e 57,1% fosfomicina, os demais antimicrobianos analisados se mostraram eficaz. (Figura 22). Para as cepas isoladas em Itanhaém, 25%

foram resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico e eritromicina e 40% foram resistentes a fosfomicina, (Figura 23).

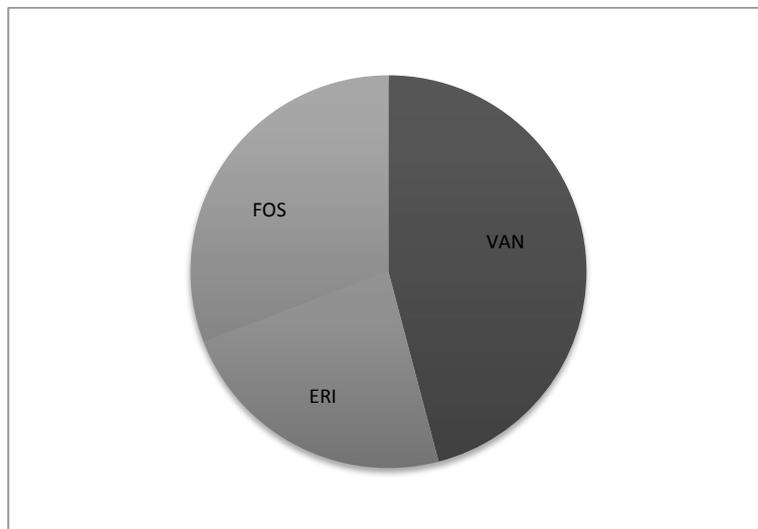


Figura 22. Porcentagem de cepas de *Escherichia coli* isoladas do sedimento coletado em Santos resistentes aos antimicrobianos testados, sendo VAN (vancomicina – 85%), ERI (eritromicina – 43%) e FOS (fosfomicina – 57,1%)

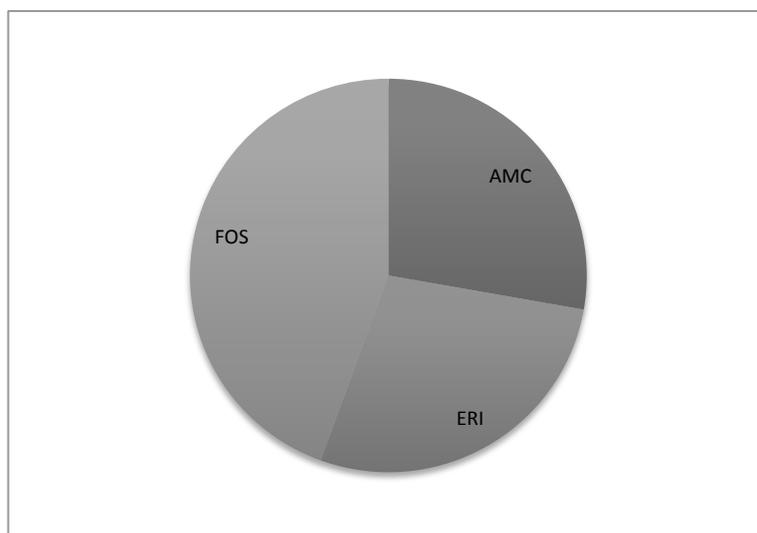


Figura 23. Porcentagem de cepas de *Escherichia coli* isoladas do sedimento coletado em Itanhaém resistentes aos antimicrobianos testados, sendo AMC (amoxicilina + ácido clavulânico – 25%), ERI (eritromicina – 25%) e FOS (fosfomicina – 40%)

Para as cepas isoladas dos tecidos moles dos mexilhões coletados em Santos houve total sensibilidade dos antimicrobianos analisados. Já para os coletados em Itanhaém 100% se mostraram resistentes a vancomicina e eritromicina, 50% foi resistente a

fosfomicina, 20% resistente a norfloxacina e amoxicilina + ácido clavulânico e somente 10% foi resistente a levofloxacina, como indicado na figura 24.

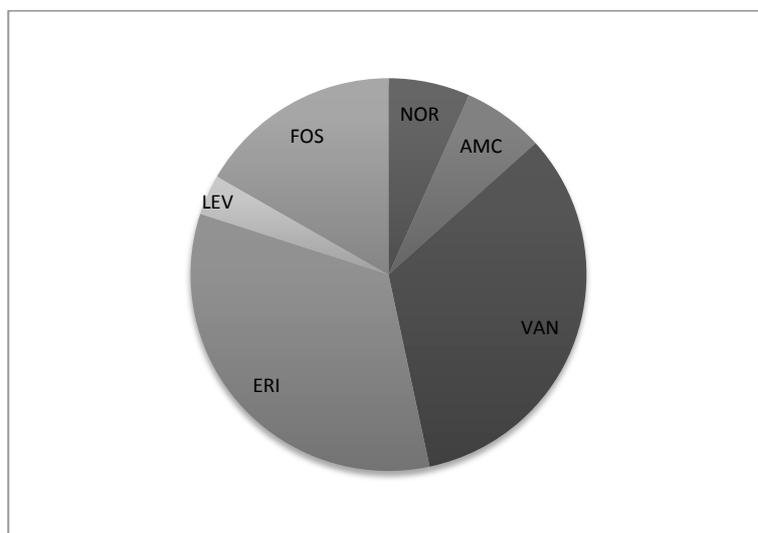


Figura 24. Porcentagem de cepas de *Escherichia coli* isoladas dos tecidos moles de mexilhão coletado em Itanhaém resistentes aos antimicrobianos testados, sendo NOR (norfloxacina – 20%) AMC (amoxicilina + ácido clavulânico – 20%), VAN (vancomicina – 10%), ERI (eritromicina – 10%), LEV (levofloxacina – 10%) e FOS (fosfomicina – 40%)

A ciprofloxacina se mostrou altamente eficiente, sendo totalmente sensível nas cepas de *Escherichia coli* isolada em Santos e Itanhaém. Isso pode ocorrer por ser um medicamento mais novo, da década de 80, que somente era utilizado no caso de múltipla resistência a outros antibióticos (Neu HC, 1988).

A sensibilidade das cepas de *Escherichia coli* em relação a ciprofloxacina também foi observado nos trabalhos de Vasconcelos (2005) e Morelli (2003), ambos analisando a resistência bacteriana em ostras do mangre.

Alguns estudos como o de Canal (2010) demonstrou a ocorrência de cepas de *Escherichia coli* altamente resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina e tetraciclina, o que vai de encontro com os resultados do presente estudo, que também mostra cepas de *Escherichia coli* resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico.

Em ambientes aquáticos, os perfis de resistência encontrados em amostras de *E. coli* apresentam grande variabilidade. Gallert *et al.* (2005) verificaram linhagens de *Escherichia coli* com elevados índices de resistência à penicilina, ampicilina e vancomicina, um poços localizados próximos a canos de emissão de esgoto doméstico, resultados que vão de encontro com os apresentados ate o momento, em Santos, local de

coleta próximo ao emissário submarino, houve grande resistência a vancomicina. Esses resultados apontam à influência da emissão de efluentes na contaminação de águas e na veiculação de microrganismos resistentes, implicando em riscos à saúde.

A norfloxacinina se mostrou uma droga sensível para as cepas analisadas nesse estudo, corroborando o trabalho apresentado por Blanco (1997), já Lambie *et al.* (2000) em seus estudos relataram índices de resistência significativos para esse antibiótico.

A fosfomicina apresentou significativa resistência para as amostras coletadas em Itanhaém, o mesmo não acontece para as amostras de Santos, onde apenas no sedimento houve cepas resistentes a esse medicamento. Cardoso *et al.* (2002) também relatam alta resistência da fosfomicina a cepas de *Escherichia coli*, corroborando esse estudo.

4.5 Resistência a antimicrobianos de *Aeromonas sp*

As análises da resistência a antimicrobianos de *Aeromonas sp* mostraram que as cepas isoladas da água de Santos e de Itanhaém apresentaram padrões de resistência muito similares, sendo de 56,7% 53% respectivamente. Em relação ao sedimento de Santos 23,8% das cepas isoladas foram resistentes a pelo menos a um antimicrobiano enquanto que, no sedimento de Itanhaém apenas 4,8% foram resistentes. Para os tecidos moles de mexilhão coletados em Santos, as cepas resistentes foram de 42,3%, enquanto em Itanhaém foi de 28,5%, (Figura 25).

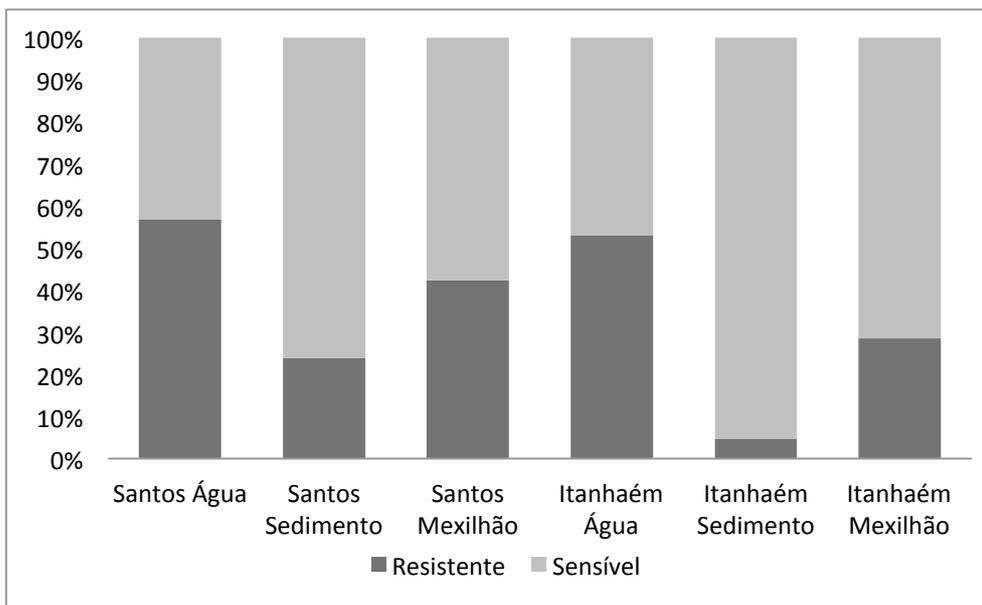


Figura 25. Porcentagem de *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos isolados de água, sedimento e tecidos moles de mexilhão coletados em Santos e Itanhaém

A problemática da múltipla resistência mais uma vez é comprovada no presente estudo. Nas amostras coletadas nas águas de Santos houve resistência a até seis antibióticos, o mesmo acontece para os organismos filtradores coletados em Santos, com 12% e para as amostras de água de Itanhaém, onde 14% das cepas analisadas foram resistentes a seis antibióticos. Fato que se mostra muito preocupante pois os valores aumentam quando falamos na resistência a quatro ou cinco antimicrobianos, como podemos ver na figura 20, que 55% das cepas isoladas das águas de Santos foram resistentes a quatro antibióticos (Figura 26).

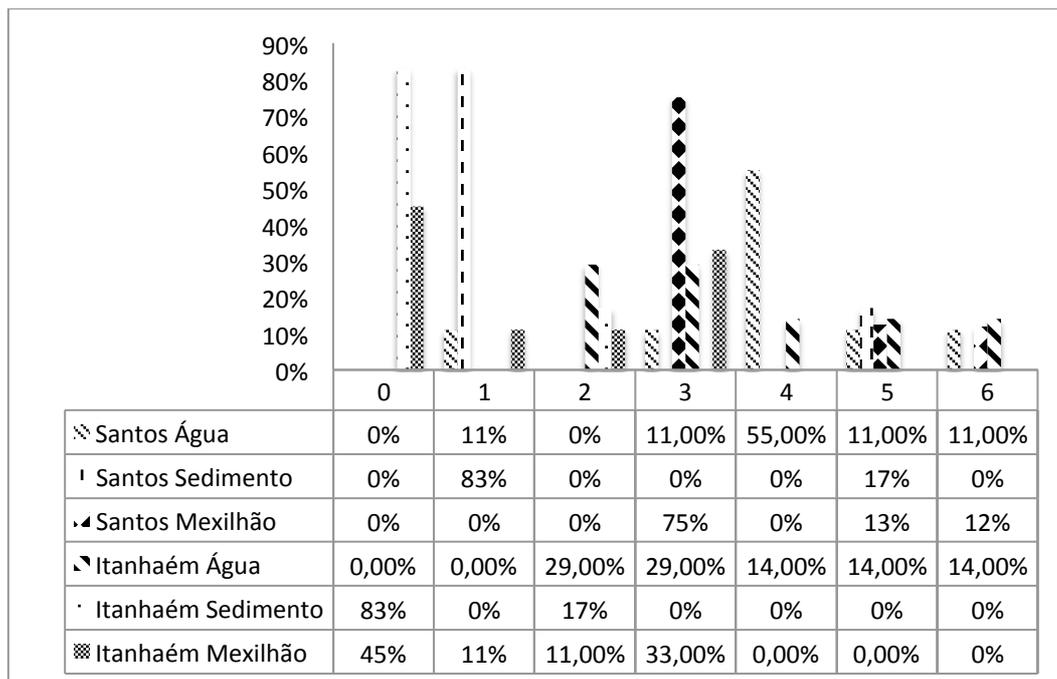


Figura 26. Porcentagem de cepas de *Aeromonas sp* isolados de água, sedimento e tecido moles de mexilhão, coletados em Santos e Itanhaém resistentes a múltiplos antimicrobianos.

Esse tipo de resistência pode ser em virtude da utilização de várias drogas para o tratamento e profilaxia de doenças, muitas vezes utilizado de forma indiscriminada (Schmidt *et al.*, 2000), considerando que a seleção de clones bacterianos multirresistentes ocorra principalmente em ambientes hospitalares e de produção animal (Teuber, 2001). Além de que, os animais contaminados com esses genes de resistência são considerados uma das principais vias para o carregamento de bactérias resistentes aos antibióticos para os seres humanos (Howgate, 1998).

Evangelista-Barreto *et al.* (2010) em seu trabalho com no Rio Cocó no Ceará, Brasil, isolou sete espécies diferentes de *Aeromonas* e testou a resistência frente a oito antibióticos, sendo que 60% apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, corroborando os dados encontrados no presente estudo.

Mejdi *et al.* (2010) em sua pesquisa com águas do mar e mexilhões para determinar a sensibilidade *in vitro* de *Vibrio ssp* e *Aeromonas ssp* frente a 12 antimicrobianos, comprovou que a maioria se mostrou resistente a pelo menos dois agentes antimicrobianos, os mesmos resultados foi encontrado no presente estudo.

Fato esse que traz um grande problema para a saúde pública, visto que alguns estudos apontam que as bactérias do gênero *Aeromonas* são um dos principais causadores

de perdas na piscicultura sendo um importante patógeno encontrado na água, solo, fezes humanas e animais (Gram *et al.*, 1999). Além do que essas bactérias são importantes agentes causadores de gastroenterites transmitidas aos seres humanos pelo contato e consumo de carne e água contaminadas (Abdullah *et al.*, 2003).

As amostras de água coletadas em Santos apresentaram uma resistência de 85,7% a cefuroxima, 77,7% a ceftriaxona e gentamicina e 100% a cefalotina mostrando-se os maiores índices de resistência. Para os demais antibióticos testados houve resistência de 22,2% para ciprofloxacina e tetraciclina, sendo o mais eficiente a norfloxacina com apenas 11,1% das cepas resistentes (Figura 27). Já para água coletada em Itanhaém, 100% das cepas foram resistentes à cefalotina e cefuroxima, enquanto 57,1% foram resistentes a tetraciclina, 42,8% à ceftriaxona, 28,5% à norfloxacina e gentamicina, se mostrando mais eficaz a ciprofloxacina com apenas 14,2% de cepas resistentes (Figura 28).

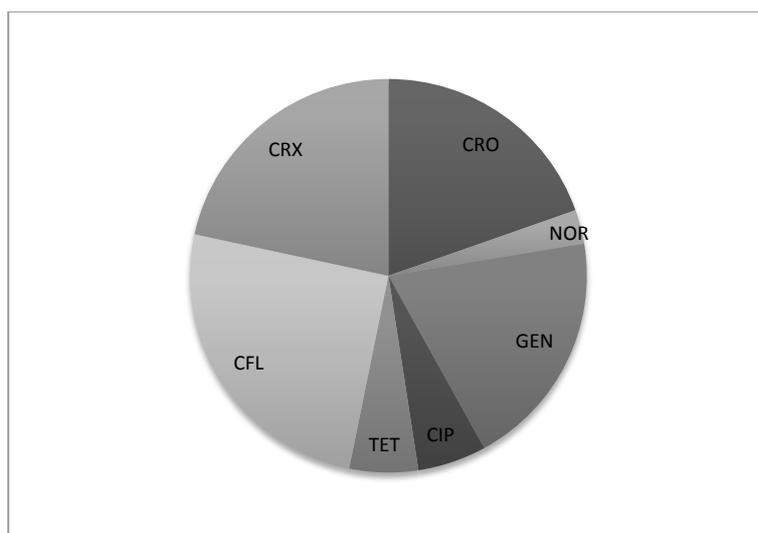


Figura 27. Porcentagem de cepas de *Aeromonas sp* isoladas da água coletado em Santos resistentes aos antimicrobianos testados sendo, CRO (ceftriaxona – 77,7%), NOR (norfloxacina – 11,1%), GEN (gentamicina – 77,7%), CIP (ciprofloxacina – 22,2%), TET (tetraciclina – 22,2), CFL (cefalotina – 100%) e CRX (cefuroxima – 85,7%)

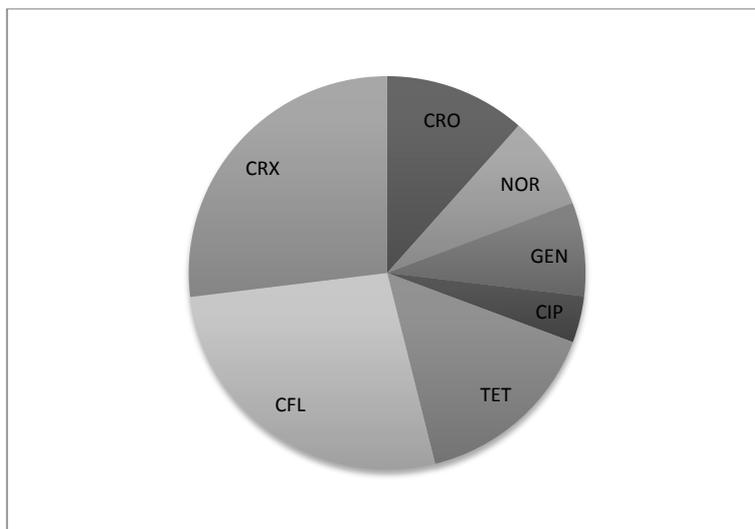


Figura 28. Porcentagem de cepas de *Aeromonas sp* isoladas da água coletada em Itanhaém resistentes aos antimicrobianos testados sendo, CRO (ceftriaxona – 42,8%), NOR (norfloxacina – 28,5%), GEN (gentamicina – 28,5%), CIP (ciprofloxacina – 14,2%), TET (tetraciclina – 57,1%), CFL (cefalotina – 100%) e CRX (cefuroxima – 100%)

Para as amostras de sedimento coletadas em Santos apresentaram uma resistência de 100% para cefalotina, de 16,6% para ceftriaxona, norfloxacina, gentamicina e cefuroxima, sendo totalmente eficiente para ciprofloxacina e tetraciclina (figura 29). As cepas isoladas do sedimento de Itanhaém houve resistência somente de 16,6% para cefalotina e cefuroxima, para os demais não houve resistência (figura 30).

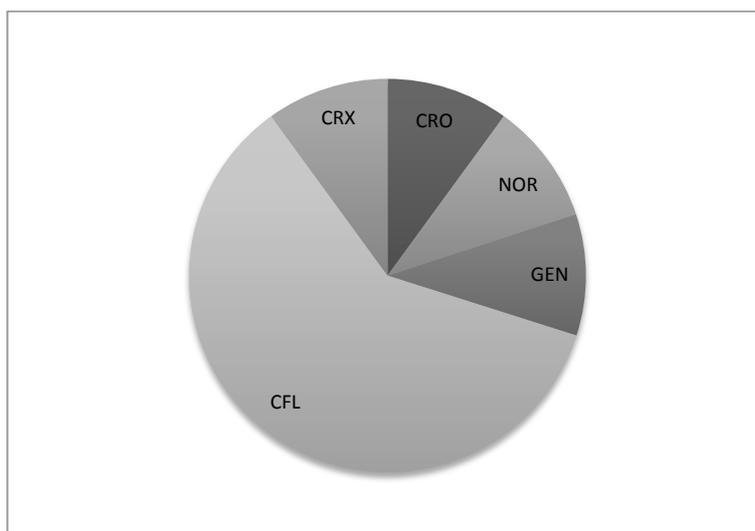


Figura 29. Porcentagem de cepas de *Aeromonas sp* isoladas do sedimento coletado em Santos resistentes aos antimicrobianos testados sendo, CRO (ceftriaxona – 16,6%), NOR (norfloxacina – 16,6%), GEN (gentamicina – 16,6%), CFL (cefalotina – 100%) e CRX (cefuroxima – 16,6%)

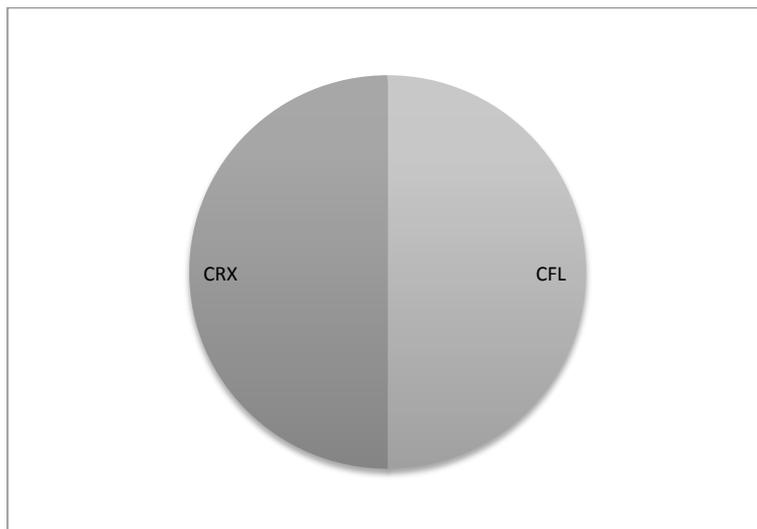


Figura 30. Porcentagem de cepas de *Aeromonas sp* isoladas do sedimento coletado em Itanhaém resistentes aos antimicrobianos testados sendo, CFL (cefalotina – 16,6%) e CRX (cefuroxima – 16,6%)

Por fim para as amostras de mexilhão coletados em Santos, houve resistência de 100% das cepas para cefuroxima, 87,5% para tetraciclina, 33,3% para cefalotina, 25% para ceftriaxona e gentamicina e de 12,5% sobre a norfloxacin e ciprofloxacina (figura 31). Já para os coletados em Itanhaém resistência de 100% para cefalotina, 55% tetraciclina e de 44% para cefuroxima (figura 32).

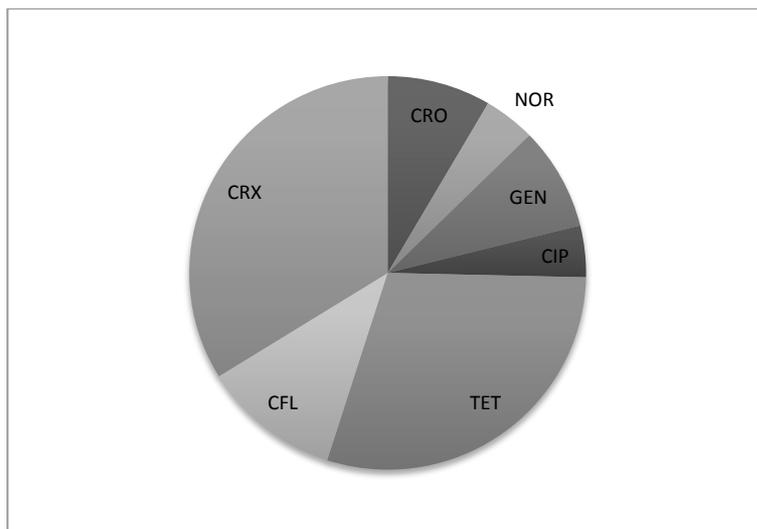


Figura 31. Porcentagem de cepas de *Aeromonas sp* isoladas do tecidos moles de mexilhão coletado em Santos resistentes aos antimicrobianos testados sendo, CRO (ceftriaxona – 25%), NOR (norfloxacina – 12,5%), GEN (gentamicina – 25%), CIP (ciprofloxacina – 12,5%), TET (tetraciclina – 87,5%) CFL (cefalotina – 33,3%) e CRX (cefuroxima – 100%)

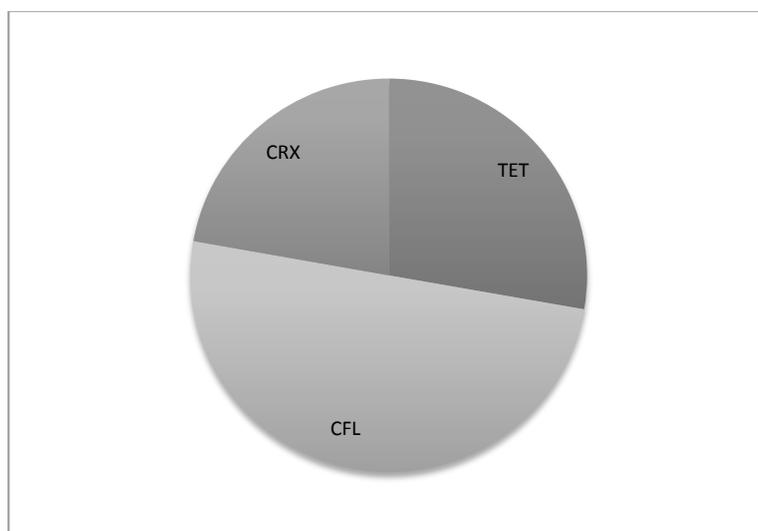


Figura 32. Porcentagem de cepas de *Aeromonas sp* isoladas do tecidos moles de mexilhão coletado em Itanhaém resistentes aos antimicrobianos testados sendo, TET (tetraciclina – 87,5%) CFL (cefalotina – 33,3%) e CRX (cefuroxima – 100%)

A resistência a tetraciclina e gentamicina também foram encontradas em outros trabalho, como Ghenghesh *et al.* (2001), em seu estudo com águas de poço; Son *et al.* (1997), também encontrou resistência desses antibióticos em *Aeromonas hydrophila* em

cepas isoladas em tilapia; Ishida *et al.* (2010) em seu trabalho realizado em sistemas de piscicultura no Egito encontrou resistência à tetraciclina, corroborando o presente estudo.

Scoaris *et al.* (2008) isolou cepas de *Aeromonas* a partir de água mineral, essas apresentaram múltipla resistência, porém foram 100% sensíveis a ciprofloxacina, o mesmo pode ser visto nesse estudo, onde esse antibiótico apresentou altas taxas de sensibilidade.

Ko *et al.* (1998) encontraram altas taxas de resistência a cefalotina, em torno de 75%, ao analisarem cepas de *Aeromonas* isoladas de pacientes com infecção corroborando os resultados encontrados aqui, que apresentam resistência de até 100% as cepas analisadas.

Altas taxas de resistência aos antimicrobianos analisados é muito preocupante, visto que esse grupo de microrganismos formam biofilmes contribuindo para o aumento dessa resistência (Isonhood & Drake, 2002). Além do que alguns estudos provam que esse gênero possuem capacidade de sobreviver e se multiplicar em alimentos mantidos sob refrigeração ou até mesmo após cozimento (Pereira *et al.*, 2004).

5.0 Conclusão

As densidades de microrganismos isolados dos sedimentos demonstram um fator preocupante, uma vez que as areais não fazem parte do programa de monitoramento de praia da Cetesb, e elas apresentam valores muito superiores comparado com a coluna de água. O problema é potencializado uma vez que, estudos já demonstraram que a população passa a maior parte do tempo nessa faixa de areia.

Outra atenção deve ser dada para os mexilhões, esses apresentaram as maiores densidades de microrganismos encontradas em todo o trabalho, caracterizando uma contaminação crônica. Fato que se torna grave, visto que esses organismos são utilizados como fonte de alimentos.

Os valores de densidade dos microrganismos do gênero *Enterococcus sp* sugerem mais uma vez que esses são excelentes indicadores de contaminação fecal.

Não existem padrões para as bactérias do gênero *Aeromonas sp* uma vez que as mesmas não fazem parte dos programas de monitoramento, porém deve ser dada uma atenção para esses microrganismos visto as altas densidades encontradas nas águas, areias e principalmente nos mexilhões.

Também foram encontradas altas taxas de resistência bacteriana para os três microrganismos analisados, um problema sério de saúde pública, uma vez que, os

microrganismos passam pela seleção natural, tornando as drogas ineficientes, dessa maneira, de tempos em tempos as drogas são cada vez mais fortes, com microrganismos cada vez mais resistentes.

Contudo é necessário um programa de monitoramento severo para o ambiente costeiro, como o tratamento de esgotos, disposição correta dos emissários, educação ambiental, coleta de lixo, entre outros, para minimizar tais impactos.

6.0 Referencias Bibliográficas

ABESSA, D.M.S.; ZARONI, L.P.; SOUSA, E.C.P.M.; GASPARRO, M.R.; PEREIRA, C.D.S.; RACHID, B.R.F.; DEPLEDGE, M.; KING, R.S. Physiological and Cellular Responses in Two Population of the Mussel *Perna perna* Collected at Different Sites from the Coast of São Paulo, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.48, n.2, p.217 – 225, March 2005.

ABESSA, D. M. S.; RACHID, B. R. F.; MOSER, G. A. O.; OILIVEIRA, A. J. F. C. Revisão: 2012. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos. *O Mundo da Saúde*, 36:643-661.

ABDULLAH, A.I.; HART, C.A.; WINSTANLEY, C. Molecular characterization and distribution of virulence associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, p.1001-1007, 2003.

AFIFI, S.; ELMANAMA, A.; SHUBAIR, M. Microbiological assessment of beach quality in Gaza Strip. **Egypt. J. Med. Lab. Sci.**, v.9, 2000.

APHA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA, AWWA, WEF. 22th Edition. 2012.

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.

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.

ANDRADE, V.C.; ZAMPIERI, B. D.B.; BALLESTEROS, E. R.; PINTO, A.B.; OLIVEIRA, A.J.F.C. Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands. *Environ Monit Assess* (2015) 187: 342

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, 10 jan. 2001.Brasil.

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

BARTRAM, J.; REES, G. 2000. **Monitoring Bathing Waters: a practical guide to design and implementation of assessments and monitoring programmes.** E & FN Spon. New York, NY, 2000. p.175-179.

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

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 4, 523-530, 2003.

BLANCO, J.E.; B LANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.2184-2185, 1997.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 1999. Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas. CENEPI/FUNASA/MS. Documento Técnico (4 volumes).

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.

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.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; Z ANATTA , G.F. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.69, n.2, p.1-5, 2002.

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

CETESB (São Paulo). Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo, 2015.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2000). Resolução n.274, Recomenda a adoção de sistemáticas de avaliação de qualidade das águas. Brazil: Conselho Nacional do Meio Ambiente.

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.

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.

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.

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.

DRASAR, B. S. & HILL, M.J. Human intestinal flora. Academic Press, London, p.36-43, 1974

DUFOUR, A.P. Bacterial indicators of recreational water quality. *Can. J. Public Health*, Ottawa, v. 75, n. 1, p. 49-56, 1994.

ELOFSSON K., GREN, I. M., and FOLMER, H. 2003. Management of eutrophicated coastal ecosystems: a synopsis of the literature with emphasis on theory and methodology. *Ecological Economics* 47: 1–11.

ELMANAMA, A. A., FAHD, M. I., ABDALLAH, A. S., & BAHR, S. (2005). Microbiological beach sand quality in Gaza Strip in comparison to seawater quality. *Environmental Research*, 99, 1–10.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; CARVALHO, F.C.T.; VIEIRA, R.H.S.F., REIS, C.M.F.; MACRAE, A.; RODRIGUES, D.P. Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. *Brazilian Journal Microbiology*, v.41, n.2, p.452-460, 2010.

EUZÉBY, J.P. 2011. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Enterococcus*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>. Acesso em: 15 mai. 2011.

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.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. *Aeromonas hydrophila*. In: *Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*, 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070523.htm>>. Acesso em: fev. de 2011.

GALLERT, C.; FUND, K.; WINTER, J. 2005. Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 106-112.

GHENGHESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; TAHRUNI, A.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 169-173, Feb. 2001.

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.

GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, T. F.

Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.3, p.969-973, 1999.

HENRIQUES, M.B.; PEREIRA, O.M.; ZAMARIOLLI, L.A.; FAUSTINO, J.S. 2000 Contaminação bacteriológica no tecido mole do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) coletado nos bancos naturais do litoral da Baixada Santista. *Arquivos de Ciências do Mar, UFCE – LABOMAR, Fortaleza*, 33: 69-76.

HOWGATE, P. Review of public health safety of products from aquaculture. *International Journal Food Science and Technology*, Oxford, v. 33, p. 99-125, 1998.

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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ E CENTRO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA "PROFESSOR ALEXANDRE VRANJAC". Diarréia e rotavírus. *Rev. Saúde Pública, São Paulo*, v.38, n.6, p.844-845. Dec. 2004.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. Acessado em 20/02/2016, <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=354850>

ISHIDA Y.; AHMED, A.M.; MAHFOUZ, N.B.; KIMURA, T.; EL-KHODERY, S.A.; MOAWAD, A.A.; SHIMA- MOTO, T. Molecular analysis of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.72, n.6, p.727-734, 2010.

JAWETZ, E. *et al.* *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 519 p.

KO, W.C.; WU, H.M.; C HANG, T.C.; YAN, J.J.; WU, J.J. Inducible β -lactamase resistance in *A. hydrophila*: therapeutic challenge for antimicrobial therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.11, p.3188-3192, 1998.

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.

LEWIS, D.H.; PLUMB, J.A. Bacterial disease. Principal diseases of farm-raised catfish. Auburn : Souther Coop. Ser. Alabama Agriculture Exp. Stn, p.115-124,1979.

LAMBIE , N.; GELEKA, M.; BROWN, G.; RYAN, J. Retrospective study on *Escherichia coli* infection in broilers subjected to postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. *Avian Dis.*, v.44, p.155-160, 2000.

MARTINEZ, D.I & OLIVEIRA, A. J.F.C., Faecal bacteria in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) for biomonitoring coastal waters and seafood quality. *Braz. Journal oceanogr.* vol.58 no.spe3 São Paulo, 2010.

MEJDI, S.; EMIRA, N.; ALI, M.; HAFEDH, H.; AMINA, B. Biochemical characteristics and genetic diversity of *Vibrio* spp. and *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the Lac of Bizerte (Tunisia). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.26, p.2037-2046, 2010.

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.

MORELLI, A. M. F. *et al.* Indicadores de contaminação fecal para ostra-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae*) comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. *Higiene Alimentar*, v. 17, n. 113, p. 81-88, 2003.

MUNN, C.B. Marine Microbiology: Ecology and Applications. New York: Bios Scientific Publishers, 2004. p. 282.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Second ed, 2010.

NEU HC. Quinolones: a new class of antimicrobial agents with wide potential uses. Med Clin North Am 1988; 72: 623-36.

NIJSTEN, R.; LONDON, N.; BOGAARD, A.; STOBBERINGH, V.D. Antibiotic resistance of enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs. Vet. Quart., v.15, n.4, p.152-157, 1993

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.

OTWAY, N.M. Assessing impacts of deepwater sewage disposal: A case study from New South Wales, Australia. Marine Pollution Bulletin, v. 31, p. 347 – 354, 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.31n.4, p.799-804, apr. 1997.

PALU, A. P.; GOMES, L. M.; MIGUEL, M. A. L.; BALASSIANO, I. T.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C.; OLIVEIRA, S. S. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. Food Microbiology, Oxford, v.27, p. 504-509, 2006.

PEREIRA, C.S; Possas, C. A.; Viana, C. M.; Rodrigues, D. P. *Aeromonas* spp. E *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 24(4): 562-566, out.-dez. 2004.

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.

PINHATA, J. M. W.; OLIVEIRA, A.J.F.C., Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research* 42 2242– 2250, 2008.

PINTO, A. B; PEREIRA, C. R; OLIVEIRA, A.J.F.C., 2012. Densidade de *Enterococcus* sp em águas recreacionais e areias de praias do município de São Vicente – SP, Brasil e sua relação com parâmetros abióticos. *O mundo da Saúde* p587 – 593.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional – evolutiva*. 7 ed. São Paulo: Editora Roca Ltda. 2005. Tradução de: *Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach*.

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.

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.

SCHMIDT, A. S.; MORTEN, S. B.; DALSGAARD, K. P. Occurrence of antimicrobial resistance in fish pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 66, p. 4908-4915, 2000.

SCOARIS, D.O.; COLACITE, J.; NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T.; ABREU FILHO, B.A.; DIAS FILHO, B.P. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.93, p.111-122, 2008.

SMITH, P. R.; BRETON, A. L.; HORSBERG, T. E.; CORSIN, F. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (Ed.). *Guide to antimicrobial use in animals*. Oxford: WilleyBlackwell, 2008. p.207-216.

SILVA, M. A. C., Ocorrência e caracterização de *Vibrio vulnificus* isolados de amostras de moluscos e água de áreas de cultivo de Santa Catarina. Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Univali, Itajaí, 2003.

SILVA, R.M.L. Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em piscicultura da região da baixada ocidental Maranhense. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2010.

SILVEIRA, M.E.M., Disseminação ambiental de bactérias e genes que conferem resistência a antibióticos e seu possível impacto na saúde pública. Trabalho de conclusão de curso apresentado a Universidade Fernando Pessoa, 2009.

SON, R.; RUSUL, G.; SAHILAH, A. M.; ZAINURI, A.; RAHA, A. R.; SALMAH, I. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia* (*Telapia mossambica*). *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 24, p. 479-482, 1997.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(3):281-301, 2000.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion Microbiology*, Oxford, v. 4, p. 493-499, 2001.

TÔRRES, R.C.O. *Escherichia coli*, p.125-139, in Vieira, R.H.S.F. (org.), *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática*. Varela Editora e Livraria Ltda., 380 p., São Paulo, 2004.

VASCONCELOS, R.H. Balneabilidade das praias de Iracema e Náutico (Fortaleza – Ceará) e pesquisa de cepas de *Escherichia coli* patogênicas em suas águas. 2005. 31 f. Monografia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

VIEIRA, R.H.S.F. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática*. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 380 p.

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.