

ANÁLISE EXPERIMENTAL SOBRE A VIABILIDADE DE *Escherichia coli* EM ÁGUA DO MAR

Experimental analysis on *Escherichia coli* viability in salt water

Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira¹, Ana Isabel Mota Silva², Oscarina Viana de Sousa², Ernesto Hofer³, Gustavo H. F. Vieira⁴, Silvana Saker-Sampaio⁵, Elenice Araújo de Lima⁶

RESUMO

Foram realizados cinco experimentos, para se investigar a resistência de cinco cepas de *Escherichia coli* isoladas das águas do rio Cocó e inoculadas em água do mar estocada em laboratório, em temperatura ambiente. Alíquotas eram retiradas do meio e as cepas eram cultivadas em temperatura de 37 e 44,5 °C. O inóculo inicial (T_i) para os experimentos foi de 166×10^9 UFC/ml. A duração de cada experimento foi de 168 h. Foram feitas contagens das células resistentes em tempos diferentes, através do teste de CCP, em PCA, nos tempos 0 (T_0), momento em que o inóculo era introduzido na água do mar, T_1 , T_2 , T_{24} , T_{72} , T_{120} e T_{168} . Até 168 h dos experimentos as células não tinham sido eliminadas completamente, havendo picos de crescimento nos tempos iniciais. Não houve diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre os experimentos, considerando que as cepas foram isoladas do mesmo local e submetidas às mesmas condições de laboratório. Talvez outros fatores, tais como raios UV, sejam mais deletérios para a célula, do que somente o sal.

Palavras-chaves: *Escherichia coli*, viabilidade, resistência de cepas, água do mar.

ABSTRACT

Five experiments were carried out in order to investigate the resistance of *Escherichia coli* strains isolated from Cocó River and inoculated in sea water, stored in laboratory at environmental temperature. The strains of *E. coli* were incubated at 37 and 44.5 °C. The initial inocule (T_i) was of 166×10^9 CFU/ml. The time of each experiment was 168 h. Sea water resistant strains were counted at T_0 (time which the inocule was introduced into the sea water), T_1 , T_2 , T_{24} , T_{120} and T_{168h} . Up to 168 h, for all experiments, it was possible to detect viable strains of *E. coli*. There was no statistically significant difference ($\alpha = 0.05$) between experiments, considering the strains were isolated from the same place and were treated on the same manner. Other factors, such as UV rays, may be more deleterious to the cell than salt concentration in sea water itself.

Key words: *Escherichia coli*, viability, strain resistance, sea water.

¹ Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Pesca e Pesquisador do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av. da Abolição, 3207, Fortaleza, CE 60165-081, Brasil.

² Engenheira de Pesca, graduada pela Universidade Federal do Ceará.

³ Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

⁴ Professor Titular do Departamento de Biologia da Universidade Vale do Acaraú-UVA, Sobral, Estado do Ceará..

⁵ Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Brasil.

⁶ Bolsista do Programa Especial de Treinamento (PET), Universidade Federal do Ceará.

INTRODUÇÃO

Em cidades litorâneas, grande parte das águas servidas quer de origem doméstica, hospitalar ou industrial são lançadas em sistemas fechados ou abertos, tratadas ou não, tendo como condutor corpos aquáticos: rios, riachos e como receptor final, o mar (Perry & Staley, 1997). O mar recebe todos os anos grandes volumes de esgotos despejados por emissários submarinos em suas águas. O resultado é o acúmulo de poluentes nas regiões costeiras, prejudicando o lazer de quem as usufrui e tornando-as potencialmente perigosa para os habitantes de suas cercanias. Os esgotos são ricos em bactérias nocivas ao homem as quais, ao entrarem em contato com o mar, sofrem morte gradual (Chamberlin, 1978). Esse fato pode não ser verdade, uma vez que há evidências da conservação da viabilidade de patógenos humanos dentro de ambientes aquáticos, apesar da incapacidade de serem cultivados (Pommepuy, 1992; Vieira, 1998), permanecendo as células intactas, submetidas à morte gradual, podendo reter plasmídios associados à virulência (Byrd, 1990) e enteropatogenicidade (Colwell, 1985). Como a morte dos patógenos não é imediata haverá um certo tempo em que eles estariam em plenas condições para contaminar os usuários e até mesmo a biota existente em seu redor.

Por ser uma bactéria de origem fecal, a *Escherichia coli* é um dos patógenos de maior importância nos estudos onde se deseja constatar contaminação por esgotos. Todavia à semelhança, das demais bactérias, ela necessita de condições favoráveis para se desenvolver. A água do mar, devido a grande concentração de sais, pode funcionar como um fator limitante para a multiplicação da *E. coli* aliado a outros fatores, tais como a temperatura, radiação e competição com outros seres vivos.

O presente trabalho tem como objetivos: determinar a resistência de *E. coli* isolada de água doce, inoculada em água do mar e incubada à temperatura ambiente (± 30 °C), através de contagens em temperaturas de 37 °C e 44,5 °C.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram isoladas 05 cepas de *Escherichia coli* a partir de amostras de água coletada no rio Cocó, em ocasiões distintas, nas imediações da favela Lagamar, Fortaleza, Ceará, no período de maio a agosto de 2000, em dias diferentes.

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

A bactéria foi isolada utilizando-se a técnica da fermentação em tubos múltiplos de acordo com Mehlman *et al.* (1984). Na sua identificação foram usados o teste IMVIC: Indol em ágar SIM (Difco), Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) em caldo MR-VP (Difco) e ágar Citrato de Simmons (Difco). Depois da caracterização da *E. coli*, as cepas puras foram mantidas em TSA, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, onde permaneceram até sua utilização.

Preparação da amostra

A água do mar, utilizada no experimento foi coletada em becker, em profundidade de cerca de 50 cm, na praia do Mucuripe, município de Fortaleza, em frascos estéreis e transportada rapidamente para o laboratório onde foi esterilizada por filtração, através de membrana Millipore 22 μ , e distribuída em alíquotas de 10 ml, em tubos. Sua salinidade foi medida em refratômetro para salinidade, marca Aquatic da Eco-System segundo Littlepage (1999). Uma vez, as amostras filtradas, alíquotas foram retiradas dos tubos e plaqueadas para comprovação da esterilidade e, posteriormente, foram usadas para controle dos experimentos, os quais constaram de cinco repetições. Cada experimento era realizado com uma cepa de *E. coli* isolada de amostras coletadas no mesmo lugar, em diferentes dias.

Preparação do inóculo e contagem de *Escherichia coli*

A partir do crescimento de 24h a 35°C em caldo TSB, foram realizadas duas experiências: 1 - Inoculando 1 ml das culturas em 10ml de água do mar esterilizada; 2- Determinando o número de bactérias viáveis, visando obter a concentração bacteriana a ser empregada como inóculo de referência (Ti). Em ambos os casos, foram retiradas alíquotas (da água do mar que seria o inóculo do experimento e do tubo de água já inoculado), diluídas e plaqueadas em Agar Plate Count (PCA). Nas duas estimativas, tanto do inóculo da água do mar, quanto do monitoramento da resistência da bactéria, utilizou-se o método de Contagem Padrão em Placas (CPP) (Silva *et al.*, 1997).

As placas de PCA das amostras, em duplicata, eram incubadas em temperaturas diferentes (37 e 44,5 °C) por 48h. Após este tempo foram então conta-

das. Assim, o tempo (h) imediatamente após a inoculação foi chamado de T_0 e os posteriores, por ordem: T_1 , T_2 , T_{24} , T_{48} , T_{72} , T_{120} , T_{144} e T_{168} . Os experimentos, em número de cinco, constaram da monitoração da resistência das células em água do mar. Cada experimento durou 168 horas.

A pureza das cepas de *E. coli*, durante todos os experimentos, era confirmada através do teste do IMViC e da coloração de Gram.

Análise estatística

A análise de variância unifatorial foi aplicada aos dados de logaritmo decimal do número de Unidades Formadoras de Colônias de *E. coli*, obtido através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas em água do mar às temperaturas de 37 °C e 44,5 °C, para um nível de significância $\alpha = 0,05$. No caso de rejeição da hipótese de nulidade, foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias duas a duas (Montgomery, 1976; Centeno, 1999).

O trabalho foi realizado em laboratório onde as condições para os tratamentos foram uniformes. Neste caso é justificável a utilização da análise de variância para experimentos inteiramente casualizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os cinco experimentos apresentaram resultados semelhantes quanto a resistência da *Escherichia coli* à água do mar, quando cultivadas à temperatura de 37 °C (Tabela I). Na mesma tabela é possível se visualizar a redução de células quando da adição do inóculo em água do mar, seguindo-se de um

grande aumento da bactéria na segunda hora do início do experimento, sendo que a cepa 2D aumentou a partir da primeira hora. A água do mar onde a cultura foi inoculada apresentou uma salinidade de 37‰. Segundo Hagler & Hagler (1988), para a maioria das bactérias entéricas, a água do mar é tóxica. A população de *E. coli*, por exemplo, é 90% eliminada em poucas horas ou poucos minutos, dependendo de vários fatores ambientais.

Tabela I – Contagem Padrão em Placas (CPP) das cepas de *Escherichia coli* inoculadas em água do mar à 37 °C. ($\times 10^6$ UFC/ml).

Amostras	Tempo (h)									
	0	1	2	24	48	72	96	120	144	168
1 ^A	36	38	152	34	31	142	51	61	32	33
3 ^A	64	35	186	57	44	87	27	62	31	44
1B	44	37	278	84	76	92	48	98	34	37
1D	48	34	273	79	67	92	38	118	37	35
2D	58	148	153	75	68	160	69	149	32	37

Observação: inóculo inicial foi de 166 bilhões de UFC/ml.

O inóculo inicial de 166 bilhões de UFC/ml de *E. coli*, quando diluído em 10 ml de água do mar, passou para 166 milhões de UFC/ml. Na contagem, logo após a inoculação, a quantidade de células medidas em 37°C variou de 36 a 64 milhões UFC/ml, significando uma redução de 78 a 61%. Nos períodos subsequentes (entre 1 e 24h) observou-se novamente um decréscimo no número de bactérias (Figura 1) e os resultados subsequentes mostraram-se repetitivos em

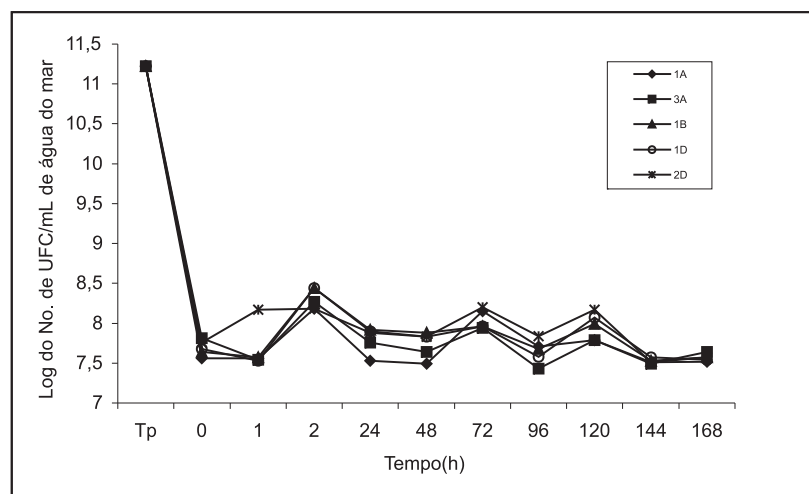


Figura 1 - Contagem Padrão em Placas das Cepas de *Escherichia coli* na água do mar, em temperatura de 44,5 °C.

relação aos tempos, com acréscimos e decréscimos, mas sempre com os picos de crescimento mais baixos em relação aos tempos de contagem iniciais (Tabela I; Figura 1).

Grimes (1986) relata a existência de enteropatógenos que sobrevivem na água do mar por um longo período atribuindo a isso o fato dessas bactérias, que são Gram-negativas, entrarem em estado de latência durante o qual elas permanecem viáveis e potencialmente virulentas.

O elevado número de coliformes está correlacionado a um maior nível de concentração de material orgânico. Conseqüentemente, não seria surpresa o fato de as águas do mar, na qual se cultivou a bactéria, mesmo depois da filtração, ainda conterem material orgânico, sob a forma solubilizada, o que de certa maneira, pôde ser utilizado como substrato para o crescimento da bactéria. Mates (1992) relatou que em experimento com água do mar muito contaminada com coliformes, ocorreu um grande aumento de *E. coli*, mesmo quando a água era estocada em baixas temperaturas, sugerindo que seu crescimento era resultado da grande quantidade de material orgânico presente na água.

O fato de no final do experimento o número absoluto da bactéria ainda permanecer alto (Tabela I) não implica em afirmar que a redução foi pequena pois em termos percentuais representou 33% do inóculo inicial, cifra bastante significativa.

Semelhante ao experimento anterior, onde as incubações para contagem foram feitas à temperatura de 37 °C, o segundo experimento à 44,5 °C também apresentou um grande decréscimo no número de células no momento da inoculação (Figura 2). Na

primeira hora do experimento a bactéria apresentou um crescimento elevado; tornando a decrescer durante a segunda hora do experimento. No período de 24 a 48h o número de células cresceu, declinando novamente no tempo de 72h; sofrendo variação na quantidade de células nos períodos de 96 a 120h. No final dos experimentos (144 e 168h), o número de bactérias permaneceu constante (Tabela II, Figura 2).

Tabela II - Contagem Padrão em Placas (CPP) das cepas de *Escherichia coli* inoculadas em água do mar à 44,5°C (x10⁶*UFC/ml).

Amostras	Tempo (h)									
	0	1	2	24	48	72	96	120	144	168
1A	36	202	30	36	106	65	35	79	35	30
3A	64	214	61	120	256	121	39	68	32	31
1B	44	203	31	37	107	64	36	78	35	32
1D	48	209	35	37	114	59	32	78	34	36
2D	58	214	31	172	225	65	36	63	33	36

Observação: inóculo inicial foi de 166 bilhões de UFC/ml.

A análise de variância, ao nível de 5% de significância, mostrou que não houve diferença significativa para os dados de logaritmo decimal do número de Unidades Formadoras de Colônias de *E. coli*, obtidos através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas em água do mar às temperaturas de 37 °C e de 44,5 °C (Tabela III). Isto se deve ao fato de que as cepas foram isoladas do mesmo local e submetidas às mesmas condições de laboratório.

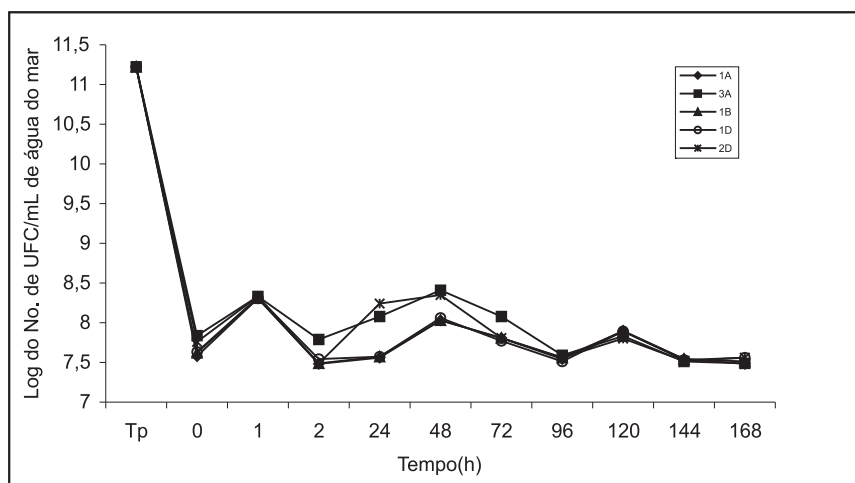


Figura 2 - Contagem Padrão em Placas das Cepas de *Escherichia coli* na água do mar, em temperatura de 44,5°C.

Tabela III – Análise de Variância dos dados de logaritmo decimal do número de Unidades Formadoras de Colônias de *Escherichia coli*, obtidos através de Contagem Padrão em Placas das cepas inoculadas na água do mar às temperaturas de 37 °C e de 44,5 °C.

Fonte de Variação	37 °C			44,5 °C		
	GL	QM	F	GL	QM	F
Entre	4	0,067	0,930 ^{ns}	4	0,060	0,667 ^{ns}
Dentro	45	0,072		45	0,090	

Observação: ns = diferença estatisticamente não-significante.

Um fator limitante ao crescimento da *E. coli* é a temperatura, tanto elevada (acima de 44,5 °C) como baixa (abaixo de 25 °C) (Pelczar *et al.*, 1996). Gameson & Gould (1975), ao contrário, já tinham observado que é mais importante como fator limitante a presença ou ausência de luz para o crescimento da *E. coli*, do que variações de temperatura.

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

Nossos experimentos foram feitos sob luz de laboratório, onde os efeitos de raios ultra violeta podem ser minimizados, razão pela qual a redução do número de bactérias no final do experimento não foi da grandeza encontrada em outros trabalhos semelhantes (Pommepuy *et al.*, 1996).

Barcina *et al.* (1990) observaram menores decréscimos nos números de UFC de *E. coli* inoculadas em água doce iluminada, do que essas mesmas culturas cultivadas em água marinha expostas à luz.

Halotolerância de *E. coli* e redução da penetração da luz, quando matéria particulada está presente, têm sido apontados como responsáveis pela sobrevivência do microrganismo por dias, semanas ou mais tempo (Pommepuy *et al.*, 1990; Pommepuy *et al.*, 1992).

O cotejamento dos nossos dados com outros apresentados nas bibliografias citadas, sugere que os sais e a luz são decisivos na viabilidade da *E. coli*, sem entretanto, identificar o mais deletério à bactéria.

Davies & Evison (1991) afirmam que vários fatores podem causar o decréscimo do número de bactérias entéricas presentes em águas ambientais incluindo sedimentação, predação, luz solar, temperatura, salinidade e deficiências nutritivas. Segundo Cabelli (1981), a aparente morte em massa dos coliformes em ambientes marinhos pode estar ligada ao fato da sua quantidade ser menor quando comparada à de bactérias patogênicas e vírus no mar.

Todos estes trabalhos não consideraram a matéria orgânica que permanece na água do mar utilizada nos experimentos e que pode ter um papel relevante na sobrevivência da *E. coli*, provavelmente, atenuando os efeitos nocivos do sal e da luz.

Concluímos que, no nosso experimento, cepas de bactéria *E. coli* plaqueadas em PCA e incubadas a 37 °C e a 44,5 °C por 48h, apresentaram, não só resistência, mas também crescimento em água do mar, por mais de uma semana, quando estocada em temperatura ambiente em laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barcina, I.; González, J. M.; Iriberry, J. & Egea, L. Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 68, p. 189 –198, 1990.
- Byrd, J. J. & Colwell, R. R. Maintenance of Plasmids pba 322 and puc 8 noncultivable *Escherichia coli* in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, p. 2104 – 2107, 1990.
- Cabelli, V. J. Epidemiology of enteric viral infections, pp. 291-304, in Goddard, D. M. & Butler, M. (eds.), *Viruses and wastewater treatment*. Pergamon Press, Oxford, 1981,
- Centeno, A. J. *Curso de estatística aplicada à biologia*. Editora da UFG (Coleção Didática), 2ª edição, 234 p., Goiânia, 1999.
- Chamberlin, C. E. & Mitchell, R. A decay model for enteric bacteria in nature waters, p. 325-368, in R. Mitchell (ed.), *Water pollution microbiology*, Vol. 2., New York, 1978.
- Colwell, R. R.; Brayton, P. R.; Grimes, D. J.; Roszak, D. R.; Huq, S. A. & Palmer, I. M. Viable, but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio Technology*, v. 3, p. 817 – 820, 1985.
- Davies, C. M. & Evison, L. M. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *J. Applied Bacteriol.*, v.70, p. 265 - 274, 1991.

- Gameson, A. L. H. & Gould, D. J. Effects of solar radiation on the mortality of some terrestrial bacteria in seawater, p. 209-219, in Gameson, A. H. L. (ed.), *Discharge of sewage from sea outfalls*, Pergamon Press, Oxford, 1975.
- Grimes, D. J.; AT Well, R. W., Brayton, P. R.; Rollins, D. M.; Roszak, D. B.; Singleton, F. L.; Trampin, M. L. & Colwell, R. R. The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiol. Scien.*, v. 3, n. 11, p. 324 – 329, 1986.
- Hagler, A. N. & Hagler, L. C. S. M. Indicadores microbiológicos de qualidade sanitária, p. 88-9, in Roitman, I.; Travassos, L. R. & Azevedo, J. L. (eds), *Tratado de Microbiologia*. Manole, São Paulo, 1988.
- Littlepage, J. L. *Oceanografia. Manual de técnicas oceanográficas para trabalhos em laboratório e a bordo*. Edições UFC, 98 p., Fortaleza, 1999 (tradução de Francisco de Assis Pereira Costa).
- Mates, A. Effect of seawater storage on coliforms, faecal coliforms and *Escherichia coli*. *Microbios*, v. 70, p. 43-48, 1992.
- Mehlman, I. J.; Andrews, W. H. & Wentz, B. A. Coliform bacteria, Cap. 5.01 – 5.07, in *Bacteriological Analytical*, 6th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1982.
- Montgomery, D. C. *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons, 418 p., New York, 1976.
- Pelczar, M. Reid & R. Chan, E. C. S. Cultivo e crescimento de microrganismos, v. 1, cap. 6, p. 168, in *Microbiologia: conceitos e aplicações*. São Paulo, 1996.
- Perry, J. J. & Staley, J. T. *Microbiology: dynamics and diversity*, Saunders College Publishing, 911 p., Fort Worth, 1997.
- Pommepuy, M.; Guillaud, J. F.; Dupray, E.; Derrien, A.; L'Yavane, J. & Cormier, M. Le devenir des bactéries en zone littorale. La mer et les Rejets Urbains. IFREMER, *Actes de Colloques*, n. 11, p. 89 - 100, 1990.
- Pommepuy, M.; Guillaud, J. F.; Dupray, E.; Derrien, A.; Leguyadei, F. & Cormier, M. Enteric bacteria survival factors. *Water Sci. Technol.*, n. 12, p. 93 - 103, 1992.
- Pommepuy, M.; Butin, M.; Derrien, A.; Gourmelon, M.; Colwell, R. R. & Cormier, M. Retention of Enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, n. 12, p. 4621 – 4626, 1996.
- Silva, N.; Junqueira, V. C. A. & Silveira, N. F. A. *Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos*. Varela, 425 p., São Paulo. Varela, 1997.
- Vieira, R.H,S.F.; Rodrigues, D.P.; Evangelista, N.S.S.; Theophilo, G.N.D. & Reis, E.M.F. Colimetry of marine waters off Fortaleza (Ceará State, Brazil) and detection of enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Intern. Microbiol.*, v. 1, p. 221 - 224, 1998.