

Comparison of bacterial densities and resistance in different beach compartments: should water be our main concern?

Bruna Del Busso Zampieri*
Raphaela Sanches de Oliveira**
Aline Bartelochi Pinto*
Vanessa da Costa Andrade*
Edison Barbieri***
Roberta Merguizo Chinellato**
Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira**

461

O Mundo da Saúde, São Paulo - 2017;40A: 461-482
Comparison of bacterial densities and resistance...

Abstract

Coastal regions are very important, since they provide food, enable economic and leisure activities however, the increase in urbanization of coastal areas are accompanied by great volumes of organic effluent, which is sometimes discharged *in natura* in water bodies, increasing the risk of the presence of pathogenic resistant bacteria in marine environments. In fact, recent studies showed higher bacterial densities in sediments than in water, since its present more favorable conditions for bacterial survivor (e.g. sun protection and predation). In addition, bivalves tend to accumulate suspended bacteria from the water, since they are filter feeding organisms. Thus, the present study evaluated densities and resistance to antibiotics of *Enterococcus* sp., *Escherichia coli* and *Aeromonas* sp. in water, sediment and mussels samples. Samples were collected at Praia dos Sonhos (Itanhaém) and Ubuqueçaba Island (Santos). Bacterial densities were determined by Membrane Filter Technique and the isolated strains were submitted to antibiotic sensibility test. Bacterial densities were lower in water and higher in sediments and mussels samples. Bacterial strains from Santos presented higher frequencies of resistance than those isolated from Itanhaém (less impacted area). *Aeromonas* strains were more resistant to Cefalotin and Cefuroxin, *Enterococcus* to Gentamicin and Streptomycin, and *E. coli* to Vancomycin and Eritromicin. The results obtained point to the need to establish public policies, laws and monitoring programs about the microbiological quality of mollusks and sediments, including the use of *Enterococcus* sp as microbiological indicator as well as about the resistance of the bacteria present in these environments.

Keywords: Water quality. Sand. Mussels. *Escherichia coli*. *Enterococcus*. *Aeromonas*.

INTRODUCTION

Coastal regions offer many benefits to man, such as obtaining food, economic activities, sports and leisure practices, among others, leading to a high population growth in these areas. The development of coastal cities leads to a high production of waste and sewage, which is not always followed by basic sanitation infrastructure¹. The sewage discharge, partially treated or *in natura*, may carry a variety of pathogenic microorganisms (e.g. bacteria, virus and protozoan), and when this pathogens reach beach waters, can expose bathers to diseases^{1,2}. This fact leads to a great concern regarding the

quality of waters and recreational sands³, and should be considered as a vital part of integrated coastal management programs⁴ due the risk to the public health.

In beaches, sediments should receive a special attention, once that they act as filters, concentrating various pollutants and storing them. Some studies have already shown that the bacterial concentrations found in the sands are higher than those find in the water column^{5,6}. This may occur because bacteria can survive longer in this environment⁷, because they find favorable nutrient conditions⁸, sun protection

DOI: 10.15343/0104-7809.201740A461482

*Department of Biochemistry and Microbiology, Bioscience Institute, Campus Rio Claro. Rio Claro/SP. Brazil.

**Instituto de Biociências, UNESP, Campos do Litoral Paulista. São Vicente/ SP, Brasil

***Institute of the São Paulo Secretary of Agriculture, Mariculture Division, Cananéia Base. Cananéia/SP. Brazil

E-mail: ajuliaf@clp.unesp.br

and protection against predation by protozoa⁹.

Although the National Council for the Environment (CONAMA), in its Resolution 274/200, defines the criteria for bathing in Brazilian waters¹⁰, it do not determine standards for sand analysis, it recommends, in its article 8, to the environmental agencies, the evaluation of the parasitological and microbiological conditions of the sand, for future standardizations.

In the State of São Paulo, Law 14.366, dated March 15, 2011¹¹, adds to the monitoring program of beaches quality, the need to analyze the sand of coastal beaches, rivers and dams, although there are still no current proposals for standards for the microbiological quality of the sands. According to Lescreck et al (2016)¹², recently, the city of Rio de Janeiro, through a Municipal Resolution (SMAC No. 468/10) established maximum limits for classification of sands for primary contact recreation. It is not recommending contact with sands in which is found concentrations of more than 3,800 colony forming units (CFU) of *Escherichia coli* per 100 g of sand¹³.

Regarding the quality of marine recreational waters CONAMA Resolution 274/2000 uses *E. coli* but, rather Enterococci as a marine water quality standard, because they present some advantages in relation to other indicators of fecal contamination, such as the ability to survive longer in water and in environments with higher salinity and greater resistance to desiccation and chlorine⁷. Besides *E. coli* and *Enterococcus*, other bacteria that is important is the *Aeromonas* sp., which in addition to causing diseases in humans, are considered emerging pathogens, especially in food but it is not take into account for the Brazilian Legislation¹⁴.

In addition to the importance of sands as reservoir for bacteria, bivalves are important compartment in coastal areas, once that they are filter feedings and may concentrate suspended matter, including pathogenic bacteria in their tissues¹². Since usually the population uses mussels as food source, it can be a serious risk to public health due to diseases caused by the consumption of contaminated bivalves.

Thus, marine water bodies that receive domestic sewage can contribute to the spread of microorganisms that present antimicrobial

resistance genes¹⁵, which can be disseminated to bacteria of the same or different species¹⁶. Sand beaches can act as a reservoir for pathogenic and resistant strains, which represent a risk to public health.

Regarding this, the present study aims to correlate the microbiological contamination levels (*Enterococcus* sp., *E. coli* and *Aeromonas* sp.) in water, sediment and mussels samples, in Santos and Itanhaém, and the resistance of the isolated bacteria strains.

METHODOLOGY

Study area

The samples were collected in two areas with different levels of contamination in Southeast coast of São Paulo State, Urubueçaba (Santos) and Praia dos Sonhos (Itanhaém) (Fig. 1). Urubueçaba Island is located in a coastal area with high level of urbanization, near to emissary and Port of Santos, the biggest port of Latin America. Once the area is located in a bay, it is a place sheltered of waves and is liable to bacteriological contamination from improper waste disposal¹³. Santos has a high demographic concentration, being the most populous city of Santos Basin, and is a tourist city, especially during the summer. The increase of population, can lead to inappropriate disposal of anthropogenic waste, compromising the quality of the environment¹⁷. In 2015, according to CETESB, all beaches of the region presented a very bad quality, according to the annual classification, showing a decrease in the water quality of these beaches¹⁸.

The Sonhos Beach (Itanhaém) is located in an open region, with strong influence of waves, being a region potentially less impacted. In addition, this city present less urbanization and lower population, leading to a smaller amount of sewage discharge into the environment Itanhaém presented, 80% of the time, beaches suitable for bathing, and Praia dos Sonhos was almost all the year suitable for bathing, revealing a better environmental quality, when compared to Santos' beaches¹⁷.

Both cities present considerable population

growth in summer and a large amount of tourists on their beaches.

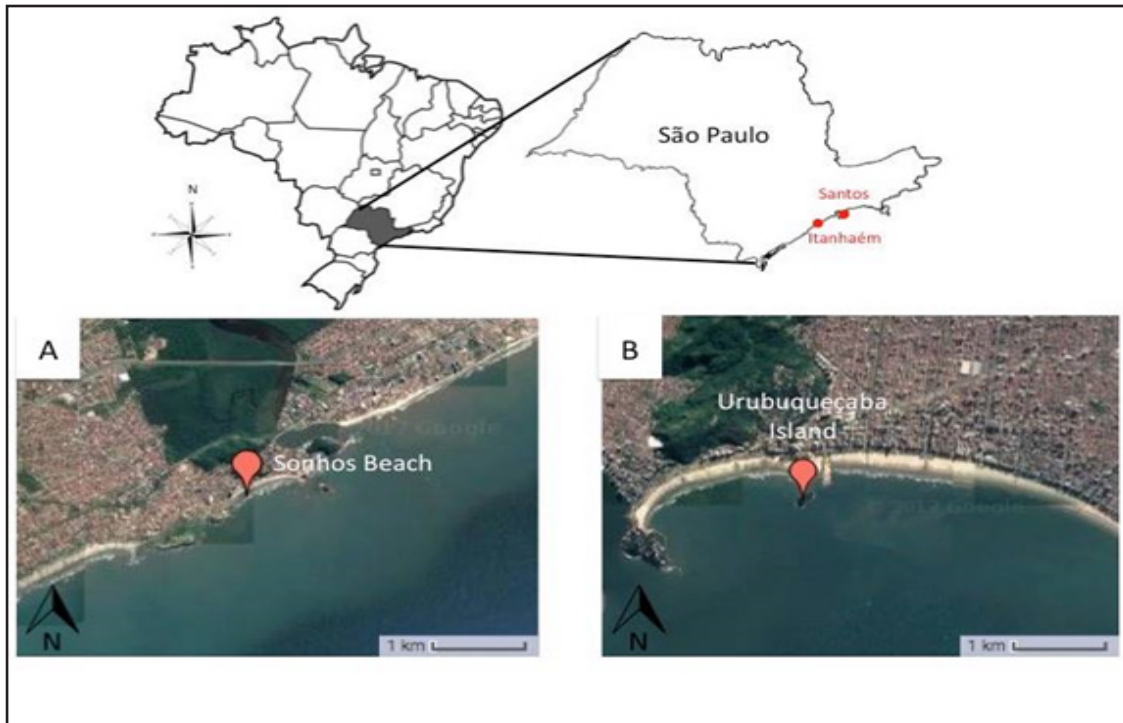


Figure 1 – Brasil map showing São Paulo State and presenting the location of sample collection sites: A) Sonhos Beach, (Itanhaém) and B) Urubuqueçaba Island (Santos). February 2016.

Sample collection

Seawater, sand and mussels samples were collected during summer (2016), at the two sites: Urubuqueçaba (Santos/SP) and Praia dos Sonhos (Itanhaém/SP) (Fig.1). Water samples were collected with sterile bottles, at 1m isobath; sand samples were collected with a sterile spatula and then transported in sterile bags; and the specimens of predominant mussels species (*Perna perna*)⁹ were collected using a sterile knife and stored in sterile plastic bags. Following, samples were maintained under refrigeration at 4°C and analyzed within 6 h at Marine Microbiology Laboratory of the São Paulo State University (Micromar - UNESP/CLP).

Microbial Quality Analysis

The bacterial densities in samples were determined using the Membrane Filter Technique¹⁹ and in the case of seawater

samples, volumes of 100mL were filtered using 0.45µm-pore size cellulose membranes. Sand and mussels samples were processed before analyses. Sand samples were weighted, added sterile distilled water (1:10), and agitated twice in a Kline agitator for 10 min to wash and extract the bacteria from the samples²⁰.

Volumes of 10 and 50mL were filtered, using 0.45µm-pore size membranes. For mussels samples, to extract the bacteria from the flesh, were used 20g of flesh and added 180mL of sterile distilled water (1:10), and homogenized in a blender. Volumes of 1 and 5mL of the dilution 10^{-1} were filtered using 0.45µm-pore size membranes. The culture media used was for microbiological determinations were mEnterococcus agar, mTEC agar and MacConkey agar for Enterococci, *E. coli* and *Aeromonas sp.* respectively.

After counting the typical colonies of each bacteria (*E. coli*, *Enterococcus sp.* and *Aeromonas sp.*) were isolated and identified by biochemical tests. The results were expressed

in colony forming unities (CFU) per 100mL for water samples, and colony forming unities (CFU) per 100g for sand and mussels samples.

Antimicrobial susceptibility testing

The microbial sensitivity tests were carried out by the agar disc diffusion method from Kirby-Bauer, using Müller-Hinton agar and following the National Committee for Clinical Laboratory Standards²¹. Colonies were randomly selected from the isolates, for the following antimicrobials: i) *Enterococcus* sp.: Ampicilin 10µg, Ciprofloxacin 5µg, Eritromicin 15µg, Gentamicin 10µg, Vancomicin 30µg, Penicillin 10µg e Estreptomicina 10µg. ii) *E. coli*: Eritromicin 15µg, Amoxicilin + Clavulanic acid 30µg, Vancomicin 30µg, Ciprofloxacin 5µg, Levofloxacin 5µg, Norfloxacin 10µg e Fosfomicin 200µg. iii) *Aeromonas* sp.: Norfloxacin 10µg, Ciprofloxacin 5µg, Gentamicin 10µg, Cephalothin 30µg, Tetracycline 30µg, Cefuroxime 30 µg and Ceftriaxone 30 µg. Strains of *E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* ATCC 35218 were used as control for the results following the criteria established by the National Committee for Clinical Laboratory Standards²¹.

RESULTS

Mean densities for *Enterococcus* sp, *Escherichia coli* and *Aeromonas* sp are listed in Table 1. It is possible to observe that *Enterococcus* densities from all samples were higher in Santos (212 UFC.mL⁻¹ for water, 2354 UFC g⁻¹ for sediment and 18181 UFC g⁻¹ for mussels) than Itanhaém (164 UFC.mL⁻¹ for water, 90 UFC g⁻¹ for sediment and 13272 UFC g⁻¹ for mussels), however not for *Escherichia coli* and *Aeromonas* sp.

For all the three bacteria, it was observed higher densities in mussels. In addition, when it was compared the compartments that are used to monitoring beach quality, it was observed much higher densities in sediment with 2354 UFC g⁻¹ and 90 UFC g⁻¹ for *Enterococcus*; 109 UFC g⁻¹ and 209 UFC g⁻¹ for *E. coli*; 2008 UFC g⁻¹ and 6536 UFC g⁻¹ for *Aeromonas* in Santos and Itanhaém, respectively. When comparing all

bacteria in the three compartments, it is possible to notice that higher densities of *Enterococcus* for almost all samples were found, followed by *Aeromonas* and *E. coli*.

Regarding bacterial resistance of *Enterococcus* strains isolated from Santos samples, the present study showed 61,90% of resistance in water, 54,00% in sediment and 47,00% in mussel samples. In Itanhaém, the *Enterococcus* resistance was 37,50% from water, 14,20% from sediment and 57,10% from mussel samples (Fig.2). *Escherichia coli* resistance from Santos samples showed 21,40% in water, 26,50% in sediment and no resistance in mussel samples. From Itanhaém samples, the percentage of resistance was 42,90% in water, 12,90% in sediment and 42,90% in mussel samples (Fig.2).

In addition, *Aeromonas* resistance from Santos samples, the percentage showed was 56,70% in water, 23,80% in sediment and 42,30% in mussel. From Itanhaém samples, the resistance in percentage was 53,00% in water, 4,80% in sediment and 28,50% in mussel samples (Fig.3).

Multiresistance is antimicrobial resistance shown by microorganism to multiple antibiotics, and consequently pose a threat to public health. Bacterial strains with multiple resistance to antibiotics were observed in both Santos and Itanhém samples. Strains isolated from Itanhaém waters showed 29% resistance to 3 antibiotics, in sediment 17% to 2 antibiotics and in mussel 33% to 3 antibiotics.

In water samples from Santos, 44,4% of *Enterococcus* sp. strains showed resistance to 4 antibiotics and 22,2% to 6 antibiotics while in the sediment 40% of isolates was resistant to 6 antibiotics and 30% to 3 antibiotics. In addition, 40% of strains from mussel were resistant to 3 antibiotics and 30% to 4. In relation to *E. coli*, strains isolated from water and sediments showed multiple resistance with 75% of water strains resistant to 2 antibiotics and 29% of sediment strains resistant to 3 antibiotics. In mussels samples multiple resistance was not observed.

For *Aeromonas* sp. in Santos, 55% of the strains isolated from water showed resistance to 4 antibiotics; 17% of the strains isolated from sandy showed resistance to 5 antibiotics;

and, 75% of the strains isolated from mussels showed resistance to 3 antibiotics.

In relation to tested antibiotics, *Enterococcus* sp. isolated from Itanhaém water samples showed higher resistance to Gentamycin (28%), Erythromycin (27%) and Streptomycin (27%) (Fig. 4) and the isolates from Santos water samples showed higher resistance to Erythromycin (23%) and Penicillin (21%). In sediment, higher resistance was seen towards Streptomycin (40%) and Gentamycin (20%), and towards Ciprofloxacin (21%) and Streptomycin (24%) from Itanhaém and Santos samples, respectively. From mussel samples in Itanhaém Streptomycin (25%) and Erythromycin (25%) had the highest rate of resistance and in Santos samples to Erythromycin (28%), Estreptomycin (24%) and Gentamicin (24%) (Fig.4).

Escherichia coli strains from water samples showed resistance to Vancomycin and Erythromycin in 33% of isolates in Itanhaém

and 50% in Santos (Fig.5). Sediment samples presented strains resistant to Fosfomicin (44%), Erythromycin (28%) and Amoxicillin + Clavulanic acid (28%) in Itanhaém and Vancomycin (46%) and Fosfomicin (31%) in Santos samples (Fig.5). Mussel samples from Itanhaém had 33% of resistance to Vancomycin and Erythromycin but no resistance in Santos samples.

Regarding *Aeromonas* sp. strains isolated from water, high percentage of resistance relates to cefalotin (27%, 25% in Itanhaém and Santos, respectively) and cefuroxin (27%, 22% in Itanhaém and Santos, respectively). From sediment samples from Itanhaém, cefalotin and cefuroxin had 50% of resistance in strains and from Santos 60% of strains showed resistance to cefalotin (Fig. 6). In mussel samples from Itanhaém, higher resistance was to cefalotin (50%), tetracycline (28%) and cefuroxin (22%), and from Santos were to cefuroxin (34%) and tetracyclin (30%).

Table 1 – *Enterococcus* sp, *Escherichia coli* and *Aeromonas* sp mean densities from water (UFC.mL-1), sediment (UFC.g-1) and mussel (UFC.g-1) samples in Santos and Itanhaém, São Paulo State (February 2016.)

	Santos			Itanhaém		
	water	sediment	mussel	water	sediment	mussel
<i>Enterococcus</i> sp	212	2354	18181	164	90	13272
<i>Escherichia coli</i>	2	109	5090	76	209	1363
<i>Aeromonas</i> sp	28	2008	8318	170	6536	818

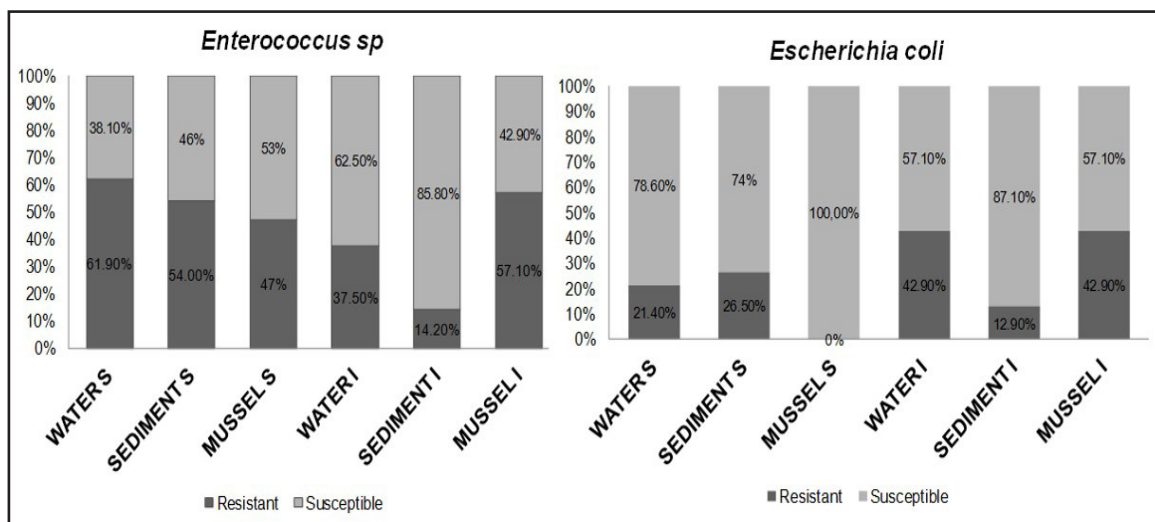


Figure 2 – Percentage of resistant strains of *Enterococcus* sp and *Escherichia coli* in Santos (SP) and Itanhaem (SP) samples (February 2016).

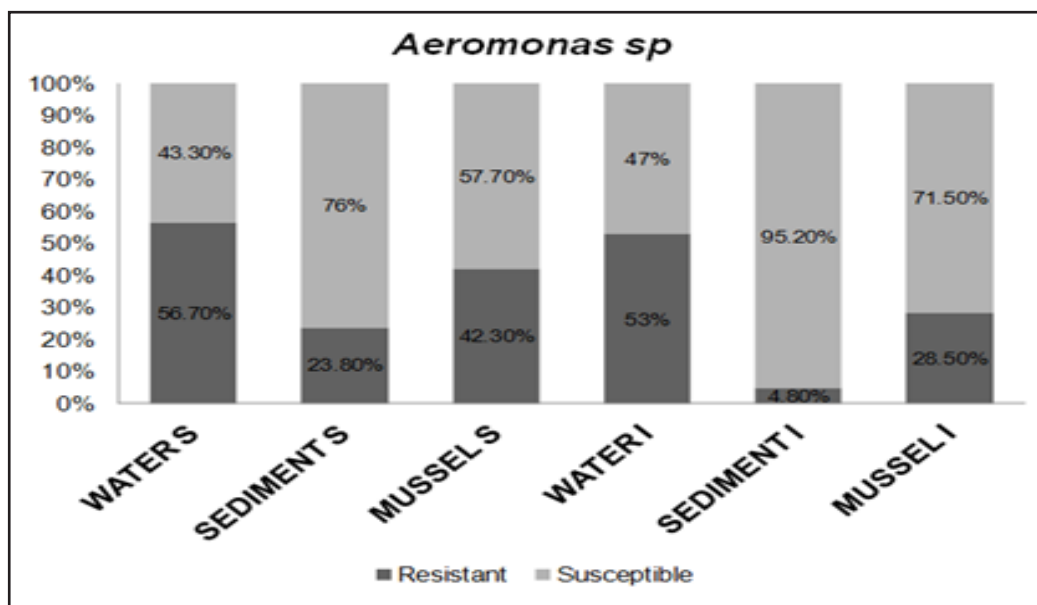


Figure 3 – Percentage of resistant strains of *Aeromonas* in samples from Santos (S) and Itanhaem (I), São Paulo State (February 2016).

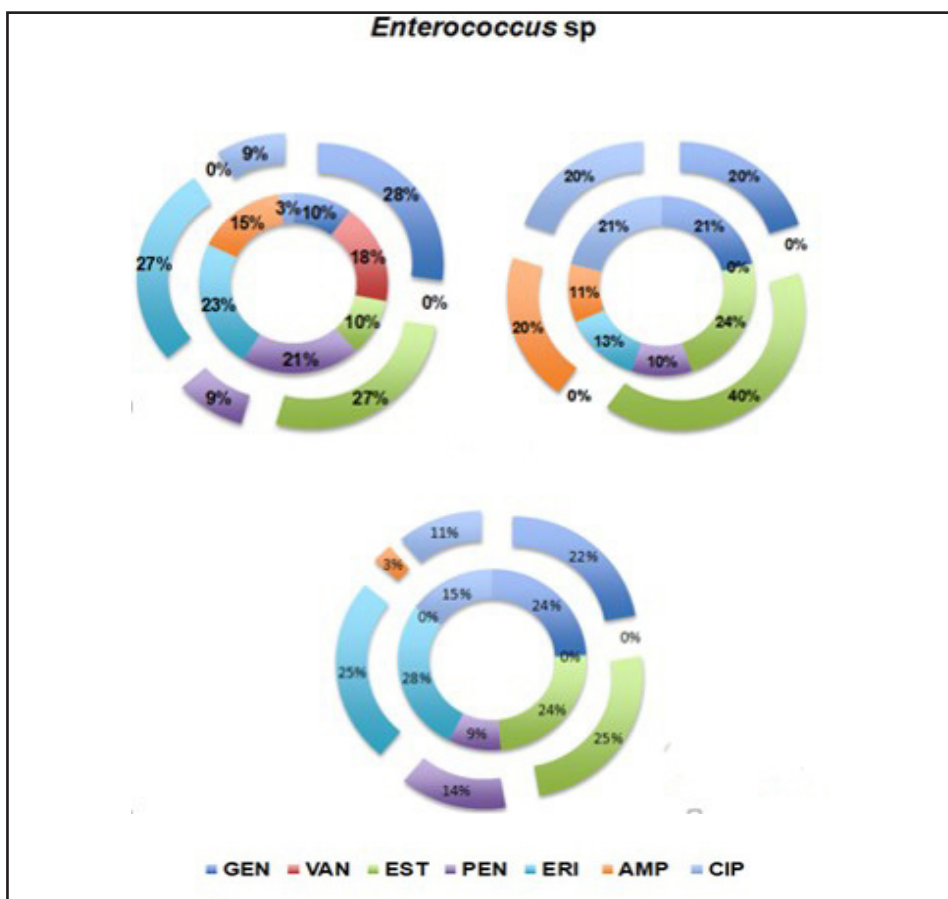


Figure 4 – Percentage of *Enterococcus sp.* resistance according to antimicrobial agents, outer circle –Itanhaém samples (February 2016); inner circle- Santos samples (February 2016) where: GEN- Gentamycin; VAN- Vancomycin; EST- Streptomycin; PEN- Penicillin; ERI- Erythromycin; AMP- Ampicilin; CIP- Ciprofloxacin.

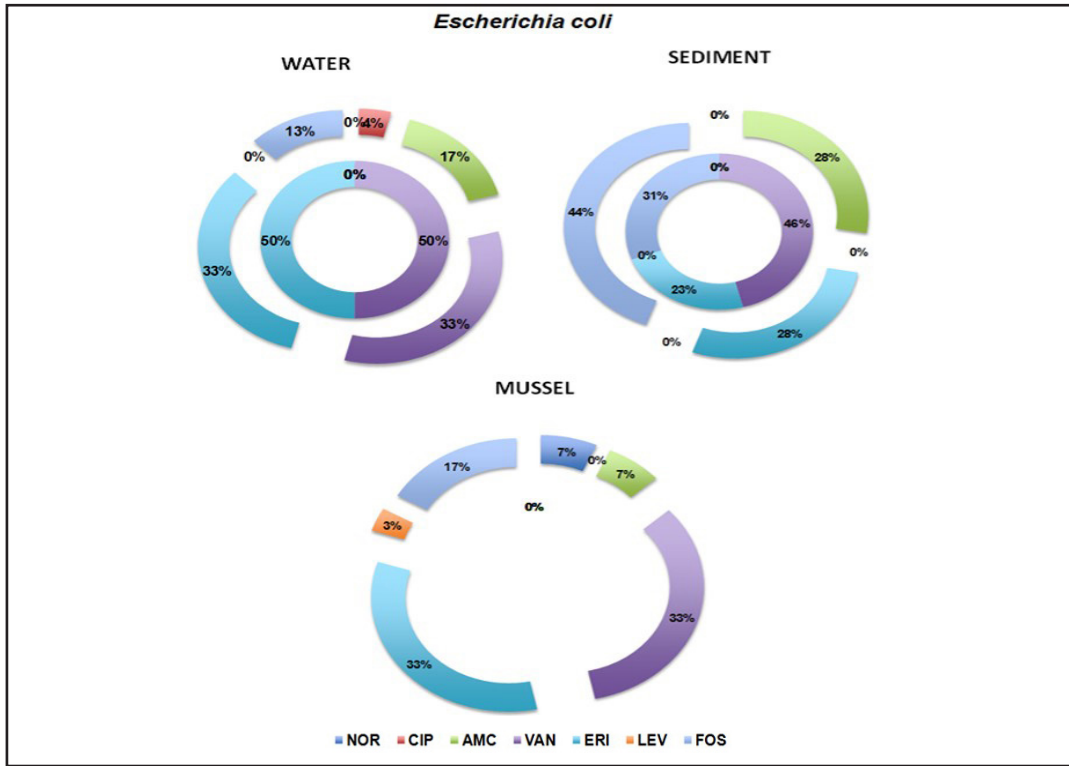


Figure 5 – Percentage of *E. coli* resistance according to antimicrobial agents, outer circle –Itanhaem samples (February 2016); inner circle- Santos samples (February 2016), where: NOR- Norfloxacin; CIP- Ciprofloxacin; AMC- Amoxicilin+Clavulanic acid; VAN- Vancomycin; ERI- Erythromycin; LEV- Levofloxacin; FOS- Fosfomicin.

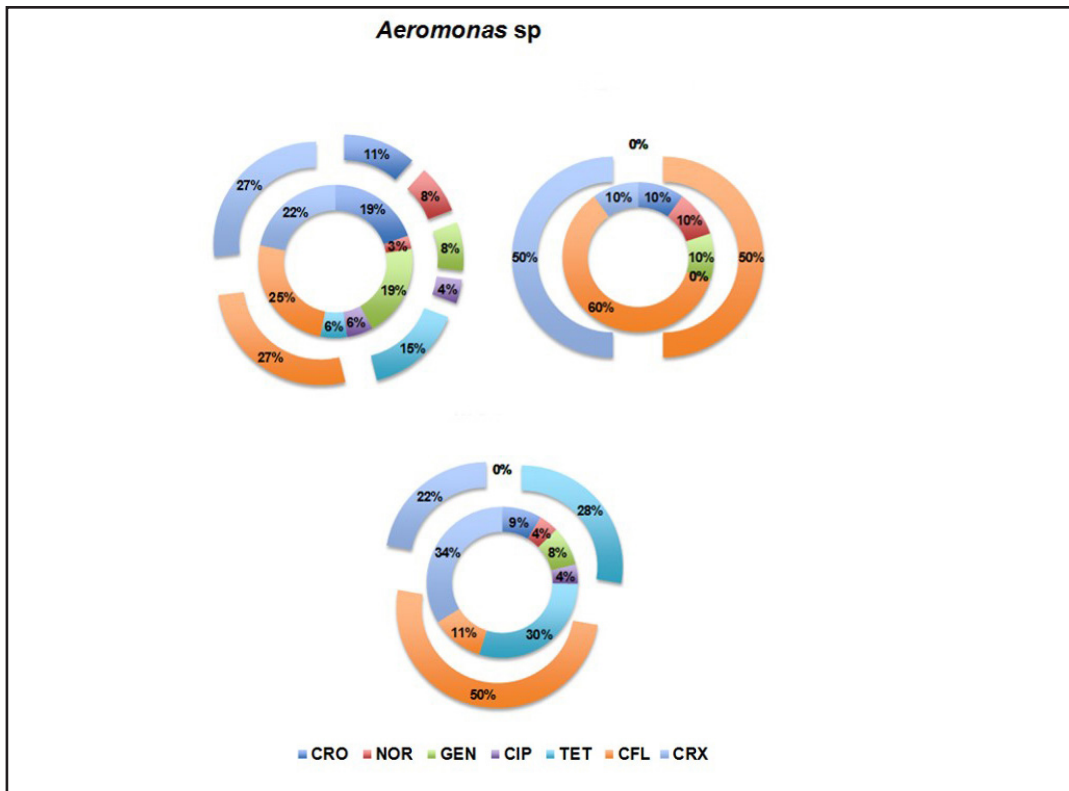


Figure 6 – Percentage of *Aeromonas sp* resistance according to antimicrobial agents, outer circle –Itanhaem samples (February 2016); inner circle- Santos samples (February 2016), where: CRO- Ceftriaxon; NOR- Norfloxacin; GEN- Gentamicin; CIP- Ciprofloxacin; TET- Tetracycline; CFL- Cefalotin; CRX- Cefuroxin;

DISCUSSION

It is known by the scientific community that diverse pathogenic bacteria populations exist in water and beach sands²². The densities of innumerable pathogenic bacteria may lead to possible public health repercussions²³. It is very important the monitoring of pathogens bacteria in beach areas because the spread of pollution in swimming zones is directly linked to the health of sea bathers, making pollution an important public health problem²⁴.

Therefore, according to Brazilian legislation²⁵ it is considered appropriate for bathing the beach that present a density of *Enterococcus* up to 400 CFU 100mL⁻¹; 2000 UFC 100mL⁻¹ of *Escherichia coli* in a single water sample. Alternatively, when 80% or more of a set of samples obtained in five weeks, collected at the same site, have a maximum of 800 *Escherichia coli* or 100 *Enterococcus* per 100 milliliters, the beaches are no longer appropriate to bath at. In this way, results obtained in the present study indicate that the water collected in Santos and Itanhaém are suitable for bathing.

It was possible to observe that the densities of *Enterococcus* sp in waters collected in Santos were superior to those obtained for Itanhaém. However, the same was not observed for *E. coli* and for *Aeromonas* sp, even Itanhaém having been considered as a beach with a better environmental quality. A factor that can explain this fact is the possibility of presence of diffuse sources of contamination near the collection site in Itanhaém.

Besides that, the results showed very high values for *E. coli*, *Enterococcus* and *Aeromonas* in sandy for the two areas. Although Brazilian legislation recommends the measure of indicators present in the sand, only in the water this monitoring is done in most of the country²⁰. According to Davies - Colley¹⁰ studies have shown that fecal indicators in seawater suffer inactivation caused by solar rays and are exposed to bacteriophage action, low nutrient content, predation and competition with native organisms. In this way, the sand of beaches would act as protectors for such microorganisms. In fact, the beach sands constitute a protective environment allowing

the survival of these bacteria, as they can adhere to sediment particles⁶. In addition, large amounts of organic debris are found adhered in the sediment, allowing the survival of these bacteria for long periods²⁶.

Therefore, it is expected higher bacteria densities in sandy when comparing to the water, and for this sediment are better indicators for beaches chronic contamination. If it was taken into account the Rio de Janeiro sandy monitoring¹⁴, according to *E. coli* densities found in sandy beaches, the two areas would be considering suitable for bathing. However, when it is analyzed *Enterococcus* densities in sandy at Santos it is possible to see that the number is much higher, and, as it was shown, *Enterococcus* is a better indicator for being more resistance to salinity, desiccation and chlorine.

In the same way, it was expected higher bacteria densities in mussels. Filtering organisms concentrate higher densities of microorganisms when compared to the water column, causing a chronic contamination. *P. perna* present a great potential to accumulate bacteria due to the way of feeding and despite this capacity, the relation between the number of bacteria in the column of the water and the bacteria accumulated by the mussel is not direct and depends on many factors¹².

Monitoring of mussels contamination can be important for preventive actions in public health, particularly in respect to the consumption of mussels as seafood. The normative instruction that regulates microbial standards in seafood is the resolution from the national agency of sanitary vigilance, ANVISA, RDC nº 12/01. Although belonging to the marine environment, fish, mussels, crustaceans and other organisms used as food have their microbiological quality evaluation based only on densities of coliforms, staphylococci and *Salmonella* sp¹¹. Moreover, as demonstrated in the present study *E. coli*, *Enterococcus* and *Aeromonas* are important indicators of contamination in the marine environment, as it was seen for water and sediment, and end up concentrating excessively on these organisms. In this way, these bacteria could be important indicators for seafood chronic contamination. When this pathogenic bacteria found in all beach compartments are resistant to antibiotics this problem can be

aggravated.

In the present study, results showed a representative percentage of resistant *Aeromonas*, *Enterococcus* and *E. coli* at the two study areas for water, sandy and mussels. The massive and uncontrolled use of antibiotics in different environments resulted in the selection of resistant bacteria²⁷. The discharge of poorly treated hospital and urban sewage effluents, the intensive use of antibiotics in aquaculture and animal production may be some of the reasons given for the presence of these resistant bacteria in food, animals and water⁷.

Recent studies²⁸ also isolated great number of pathogenic bacteria, like *Aeromonas*, *Enterococcus* and *E. coli*, demonstrating that is an important issue worldwide. Results showed that resistance rates were significantly higher on beaches receiving anthropogenic inputs. Itanhaém and Santos are cities that have sewage discharge directly in the sea, favoring the isolation of a representative number of resistant strains.

Even when, according to legislation, pathogenic bacteria densities demonstrated that beach were suitable for bathing, it was found a significant percentage of antibiotic resistant strains. Recent studies have linked the human health outcomes of increased incidence of gastrointestinal illness and diarrhea among beachgoers in Florida who spent more time in wet sand⁵ and among beachgoers who were engaged in sand contact activities (digging in sand; buried in sand)⁶. When these bacteria are resistance to antibiotic treatment, this public health problem become a problem much more difficult to solve.

Over the years, resistance to Cephalosporins among members of *Enterobacteriaceae* has increased mainly due to the spreading of Extended-spectrum B-Lactamases (ESBL) and others antibiotics²⁹. The presente study corroborate with this results since it was isolated a significant number of *E. coli* strains resistance to Vancomycin, Erytromycin and Fosfomicin. In this way, treatment for *E. coli* infection has been increasingly complicated by the emergence of resistance to most first-line antimicrobial agents³⁰.

A study of Kristich (2014)³¹ shows that aminoglycosides act by binding to the 16S rRNA

of the 30S ribosomal subunit and interfering with protein synthesis. Enterococci generally exhibit a moderate level of aminoglycoside resistance. The same were found in this study once it was isolated a representative number of strains resistance to Streptomycin and Gentamycin. This is worrisome due the fact that treatment of enterococcal infections has become one of the most challenging issues facing clinicians in the 21st century. The increased prevalence of strains that are resistant to almost all antibiotics with in vitro bactericidal activity against enterococci is an alarming trend³¹.

The use of antibiotics is one of the most important factors influencing the emergence of resistance in bacterial pathogens. Multiresistant *Aeromonas* were isolated from different parts of the world and are reported to be resistant to penicillin and Ampicillin, but sensitive to Aminoglycosides, Tetracycline, Chloramphenicol, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Quinolones, and second- and third-generation Cephalosporins³².

In this way, it was seen higher densities of these pathogenic bacteria especially in sediment and mussels, and a representative part of these strains were resistance to many antibiotics. This show the importance of improve the coastal environmental monitoring since much of the population uses these areas and end up being exposed to resistant pathogens.

A severe monitoring program is needed for Brazilian coastal areas, such as sewage treatment; correct disposal of emissaries; environmental education; waste collection and others, to minimize such impacts. In addition it is necessary create or improve standards for monitoring sediment and improve monitoring of seafood consumed by the population.

CONCLUSION

The sediment samples presented higher bacterial densities and a higher proportion of resistant strains when compared to those found in water samples, probably due to their inherent characteristics (e.g. favorable nutrient conditions, sun protection and protection against predation). This poses a serious public

health threat, since bathers spend most of their time in the sand rather than in the water, thus being more exposed to microorganisms. In turn, mussels showed higher bacterial densities when compared to the other compartments. This is probably due to the fact that they are filtering organisms, accumulating suspended matter in their tissues, including microorganisms. Of the

three studied microorganisms, *Enterococcus* sp. presented higher densities, possibly because it is a microorganism more resistant to the marine conditions. More efficient public policies, laws and monitoring programs should focus on sediment and mollusks, as well as considering the analysis of *Enterococcus* sp. as an important indicator.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). Guidelines for Safe Recreational waters – Water Environments. Volume 1: Coastal and Fresh Waters. WHO/EOS/98.14, World Health Organization, Geneva, 1998; 208p.
2. Pinhata JMW, Oliveira AJFC. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research*, 2008; 42:2242-2250.
3. Afifi S, Elmanama A, Shubair M. Microbiological assessment of beach quality in Gaza Strip. *Egypt. J. Med. Lab. Sci.*, 2000; 9.
4. Bonilla TD, Nowosielski K, Cuvelier M, Hartz A, Green M, Esiobu N, et al. Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 2007; 54:1472-82.
5. Heaney CD, Sams E, Dufour AP, Brenner KP, Haugland RA, Chern E, et al. Fecal indicators in sand, sand contact, and risk of enteric illness among beachgoers. *Epidemiology*, 2012; 23:95-106.
6. Andrade VC, Zampieri BDB, Ballesteros ER, Pinto AB, Oliveira AJFC. Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands. *Environmental Monitoring Assessment*, 2015; 187:342.
7. Davies-Colley RJ, Donnison AM, Speed DJ, Ross CM, Nagels JW. Inactivation of fecal indicator microorganisms in waste stabilization ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Research*, 1999; 33(5):1220-1230.
8. Davies CM, Bavor HJ. The fate of storm water associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. *Journal of Applied Microbiology*, 2000; 89(2):349-360.
9. Martinez DI, Oliveira AJFC. Faecal bacteria in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) for biomonitoring coastal waters and seafood quality. *Brazilian Journal of Oceanography*, 2010; 58(3).
10. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução 274. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 25 jan. 2001. Seção 1, n. 18, p. 70-71.
11. SÃO PAULO. Lei nº 14.366, 15 de março de 2011. Inclui no monitoramento das Praias a análise periódicas da qualidade da areia das praias do litoral, dos rios e represas do estado de São Paulo. *Diário Oficial, São Paulo*, 2011.
12. Lescreck MC, Petroni RGG, Cortez FS, Santos AR, Coutinho PO, Pusceddu FH. Análise da qualidade sanitária da areia das praias de Santos, litoral do estado de São Paulo. *Eng Sanit Ambient*, 2016; 21(4): 777-782.
13. Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SMAC). Resolução SMAC nº 468, de 28 de janeiro de 2010. Dispõe sobre a análise e informações das condições das areias das praias no Município do Rio de Janeiro. *Diário Oficial do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ*, 29 jan. 2010. Ano XXIII, nº 211.
14. Kühn I, Iversen A, Burman LG, Olsson-Liljequist B, Franklin A, Finn M, Aarestup F, Seyfarth AM, Blanch AR, Taylor H, Caplin J, Moreno MA, 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*, 2000; 14(4):337-342.
15. Abessa DMS, Rachid BRF, Moser GAO, Oliveira AJFC. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos. *O Mundo da Saúde*, 2012; 36: 643-661.
16. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo, 2015.
17. American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA, AWWA, WEF. 22th Edition, 2012.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Second ed., 2010.
19. Heaney CD, Exum NG, Dufour AP, Brenner KP, Haugland RA, Chern E, Schwab KJ, Love DC, Serre ML, Noble R, Wade TJ. Water quality, weather and environmental factors associated with fecal indicator organism density in beach sand at two recreational marine beaches. *Science of the Total Environment*, 2014; 1: 440-447. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.113.
20. Halliday E, Gast RJ. Bacteria in beach sands: an emerging challenge in protecting coastal water quality and bather health. *Environmental Science & Technology* 2011; 45(2): 370-379. doi:10.1021/es102747s.
21. Lee JL, Kim IH, Yeon YJ, Lee J. Monitoring and analysis of bacterial communities during a summer season on Gyeongpo Beach. In: Lee, J.L.; Griffiths, T.; Lotan, A.; Suh, K.-S., and Lee, J. (eds.), *The 2nd International Water Safety Symposium. Journal of Coastal Research, Special Issue* 2017; 79: 249-253.
22. Ghinsberg RC, Leibowitz P, Witkin H, Mates A, Seinberg Y, Bar DL, et al. Monitoring selected bacteria and fungi in sand and seawater along Tel Aviv coast. *MAP Tech Rep Ser.* 1994;87:65-81.
23. Pinto AB, Pereira CR, Oliveira AJFC. 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*, 2012; 587-593.
24. Kümmerer, K. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004; 54:311-320.

25. Smaldone G, Marrone R, Cappiello S, Martin GA, Oliva G, Cortesi ML, Anastasio A. Occurrence of antibiotic resistance in bacteria isolated from seawater organisms caught in Campania Region: preliminary study. *BMC Vet Res.*, 2014; 10:161.
26. Alouache O, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C, Bahour R. Antibiotic Resistance and Extended-Spectrum B-Lactamases in Isolated Bacteria from Seawater of Algiers Beaches (Algeria). *Microbes and Environments.* 2012; 27(1):80–86.
27. Yusha' u M, Umar MI, Suleiman K. Indigenous commercial drinks as potential sources of extended spectrum B-lactamases (ESBLs) producing organisms in Kano, Nigeria. *Int J Biomed Health Sci.* 2010; 6:103-8.
28. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
29. Stratev D, Odeyemi OA. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 2016; 9:535-544.
30. Sabaté M, Prats G, Moreno E, Ballesté E, Blanch AR, Andreu A. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Research in Microbiology*, 2008; 159:288-93.
31. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
32. Stratev D, Odeyemi OA. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 2016; 9:535-544.

Comparação de densidade e resistência bacterianas em diferentes compartimentos de praia: a água deve ser nossa principal preocupação?

Bruna Del Busso Zampieri*
Raphaela Sanches de Oliveira**

Aline Bartelochi Pinto*

Vanessa da Costa Andrade*

Edison Barbieri***

Roberta Merguizo Chinellato**

Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira**

Resumo

As regiões costeiras são muito importantes, uma vez que proporcionam alimentos, permitem atividades econômicas e de lazer, no entanto, o aumento da urbanização das áreas costeiras é acompanhado por grandes volumes de efluentes orgânicos, que às vezes são descarregados *in natura* em corpos d'água, aumentando o risco da presença de bactérias patogênicas e resistentes em ambientes marinhos. De fato, estudos recentes mostraram maiores densidades bacterianas nos sedimentos do que na água, pois apresentam condições mais favoráveis para a sobrevivência bacteriana (e.g. proteção solar e de predação). Além disso, os bivalves tendem a acumular bactérias suspensas da água, pois são organismos que alimentam-se por filtração. Assim, o presente estudo avaliou densidades e resistência a antibióticos de *Enterococcus* sp., *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp. em amostras de água, sedimentos e mexilhões. As amostras foram coletadas na Praia dos Sonhos (Itanhaém) e na Ilha Ubuqueçaba (Santos). As densidades bacterianas foram determinadas pela técnica de filtro de membrana e as cepas isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antibióticos. As densidades bacterianas foram menores na água e maiores nas amostras de sedimentos e mexilhões. As cepas bacterianas de Santos apresentaram maiores frequências de resistência do que as isoladas de Itanhaém (área menos impactada). As cepas de *Aeromonas* foram mais resistentes à Cefalotina e Cefuroxime, *Enterococcus* à Gentamicina e Estreptomicina, e *E. coli* à Vancomicina e Eritromicina. Os resultados obtidos apontam para a necessidade de estabelecer políticas públicas, leis e programas de monitoramento relativos à qualidade microbiológica de moluscos e sedimentos, incluindo o uso de *Enterococcus* sp. como indicador microbiológico, bem como sobre a resistência das bactérias presentes nesses ambientes.

Palavras-chave: Qualidade da água. Areia. Mexilhões. *Escherichia coli*. *Enterococcus*. *Aeromonas*.

INTRODUÇÃO

As regiões costeiras oferecem muitos benefícios ao homem, como a obtenção de alimentos, atividades econômicas, práticas esportivas e de lazer, entre outras, levando a um alto crescimento populacional nessas áreas. O desenvolvimento das cidades costeiras leva a uma alta produção de resíduos e esgoto, o que nem sempre é seguido por infraestrutura básica de saneamento¹. A descarga de esgoto parcialmente tratada ou *in natura*, pode conter uma variedade de microorganismos patogênicos (e.g. bactérias, vírus e protozoários), e quando esses agentes patogênicos atingem as águas da praia, podem expor banhistas a doenças^{1,2}. Este fato leva a uma grande preocupação com

a qualidade das águas e areias recreativas³, e deve ser considerado como parte vital dos programas integrados de gestão costeira⁴ devido ao risco para a saúde pública.

Nas praias, os sedimentos devem receber uma atenção especial, pois atuam como filtros, concentrando vários poluentes e armazenando-os. Alguns estudos já mostraram que as concentrações bacterianas encontradas na areia são maiores do que as encontradas na coluna de água^{5,6}. Isso pode ocorrer porque as bactérias podem sobreviver por mais tempo nesse ambiente⁷, pois encontram condições nutritivas favoráveis⁸, proteção solar e proteção contra predação por protozoários⁹.

DOI: 10.15343/0104-7809.201740A461482

*Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Campus Rio Claro. Rio Claro / SP. Brasil.

** Instituto de Biociências, UNESP, Campos do Litoral Paulista. São Vicente/ SP, Brasil

*** Instituto da Secretaria de Agricultura, Divisão de Maricultura de São Paulo, Cananéia Base. Cananéia / SP. Brasil

E-mail: ajuliaf@clp.unesp.br

Embora o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), em sua Resolução 274/200, defina os critérios para banhar-se nas águas brasileiras¹⁰, não determina os padrões de análise de areia. Recomenda que as agências ambientais, no artigo 8, avaliem as condições parasitológicas e microbiológicas da areia, para futuras padronizações.

No Estado de São Paulo, Lei 14.366, de 15 de março de 2011¹¹, acrescenta ao programa de monitoramento da qualidade da praia, a necessidade de analisar a areia das praias costeiras, rios e barragens; embora ainda não haja propostas atuais de padrões para a qualidade microbiológica das areias. De acordo com Lesreck et al. (2016)¹², recentemente, a cidade do Rio de Janeiro, através de uma Resolução Municipal (SMAC nº 468/10) estabeleceu limites máximos para classificação de areias para recreação de contato primário. Ela não recomenda o contato com areias em que são encontradas concentrações de mais de 3.800 unidades de formação de colônias (UFC) de *Escherichia coli* por 100 g de areia¹³.

Quanto à qualidade das águas marinhas recreativas, a CONAMA Resolução no 274/2000 usa *E. coli* em vez de *Enterococci* como padrão de qualidade da água marinha, porque estas apresentam algumas vantagens em relação a outros indicadores de contaminação fecal, como a capacidade de sobreviver por mais tempo em água e em ambientes com maior salinidade e maior resistência a dessecação e ao cloro⁷.

Além de *E. coli* e *Enterococcus*, outra bactéria importante é a *Aeromonas sp.*, que além de causar doenças em seres humanos, é considerada um patógeno que está emergindo, especialmente em alimentos, mas não é considerada na legislação brasileira¹⁴. Além da importância das areias como reservatório de bactérias, os bivalves são um compartimento importante nas áreas costeiras, pois alimentam-se por filtração e podem concentrar matéria em suspensão, incluindo bactérias patogênicas em seus tecidos¹². Uma vez que a população geralmente usa mexilhões como fonte de alimento, pode ser um risco sério para a saúde pública devido a doenças causadas pelo consumo de bivalves contaminados.

Assim, os corpos de água marinhos que

recebem esgoto doméstico podem contribuir para a disseminação de microorganismos que apresentam genes de resistência antimicrobiana¹⁵, que podem ser disseminados para bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes¹⁶. As areias das praias podem atuar como reservatório de cepas patogênicas e resistentes, que representam um risco para a saúde pública. Em relação a isso, o presente estudo teve como objetivo correlacionar os níveis de contaminação microbiológica (*Enterococcus sp.*, *E. coli* e *Aeromonas sp.*) em amostras de água, sedimentos e mexilhões, em Santos e Itanhaém, com a resistência das cepas de bactérias isoladas.

METODOLOGIA

Área de estudo

As amostras foram coletadas em duas áreas com diferentes níveis de contaminação na costa sudeste do Estado de São Paulo, Urubuqueçaba (Santos) e Praia dos Sonhos (Itanhaém) (Fig. 1).

A Ilha de Urubuqueçaba está localizado em uma área costeira com alto nível de urbanização, perto do emissário e do porto de Santos, o maior porto da América Latina. Uma vez que a área está localizada em uma baía, é um lugar protegido de ondas e é passível de contaminação bacteriológica por eliminação indevida de lixo¹³. Santos tem uma alta concentração demográfica, sendo a cidade mais populosa da Bacia de Santos, e é uma cidade turística, especialmente durante o verão. O aumento da população, pode levar ao descarte inadequada de resíduos antropogênicos, comprometendo a qualidade do meio ambiente¹⁷. Em 2015, de acordo com a CETESB, todas as praias da região apresentaram uma qualidade muito baixa, de acordo com a classificação anual, mostrando uma diminuição da qualidade da água dessas praias¹⁸.

A Praia de Sonhos (Itanhaém) está localizada em uma região aberta, com forte influência de ondas, sendo uma região potencialmente menos impactada. Além disso, esta cidade apresenta menos urbanização e menor população, levando a uma menor quantidade de descarga de esgoto no meio ambiente. Itanhaém apresentou, em 80% das vezes, praias adequadas para o banho e a Praia dos Sonhos era adequada para se

banhar quase todo o ano, revelando uma melhor qualidade ambiental, em comparação com as praias de Santos¹⁷. Ambas as cidades apresentam

um considerável crescimento populacional no verão e uma grande quantidade de turistas nas suas praias.

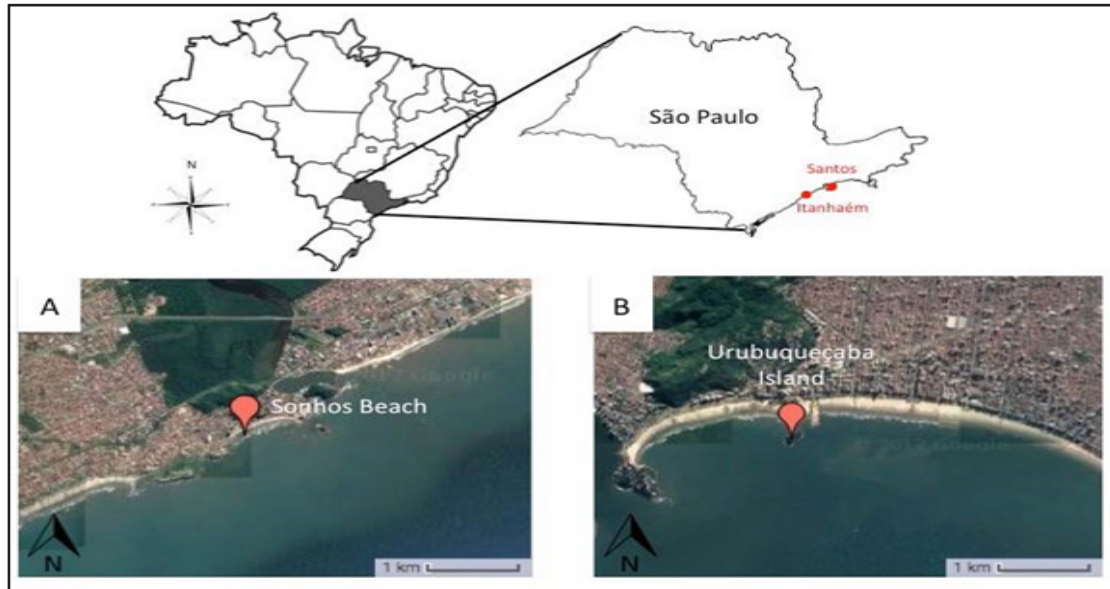


Figura 1 – Mapa do Brasil onde mostra o estado de São Paulo e apresenta a localização dos pontos de coleta de amostras: A) Praia de Sonhos, (Itanhaém) e B) Ilha de Urubuqueçaba (Santos). Fevereiro de 2016.

Coleta de amostras

As amostras de água do mar, areia e mexilhão foram coletadas durante o verão (2016), nos dois locais: Urubuqueçaba (Santos / SP) e Praia dos Sonhos (Itanhaém / SP) (Fig. 1). As amostras de água foram coletadas com garrafas estéreis, com isóbata de 1m, as amostras de areia foram coletadas com uma espátula estéril e depois transportadas em sacos estéreis, e as amostras de uma espécie predominante de mexilhão (*Perna perna*)⁹ foram coletados usando uma faca esterilizada e armazenados em sacos plásticos estéreis. Em seguida, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C e analisadas dentro de 6 horas no Laboratório de Microbiologia Marinha da Universidade Estadual de São Paulo (Micromar - UNESP / CLP).

Análise da qualidade microbiana

As densidades bacterianas em amostras foram determinadas utilizando a técnica de filtro de membrana¹⁹, e no caso de amostras de água do mar, filtraram-se volumes de

100mL por meio de membranas de celulose de tamanho de 0,45 µm/poro. As amostras de areia e mexilhão foram processadas antes das análises. As amostras de areia foram pesadas, foi adicionada água destilada estéril (1:10) e foram agitadas duas vezes em um agitador Kline durante 10 minutos para lavar e extrair a bactéria das amostras²⁰. Os volumes de 10 e 50mL foram filtrados, utilizando membranas de tamanho de 0,45 µm/poro. Para as amostras de mexilhão, para extrair as bactérias da carne, utilizaram-se 20 g de carne e foram adicionados 180 ml de água destilada estéril (1:10), e então foram homogeneizados em um liquidificador. Os volumes de 1 e 5mL da diluição 10-1 foram filtrados usando membranas de tamanho de 0,45 µm/poro. O meio de cultura utilizado para determinações microbiológicas foram ágar de Enterococcus, ágar mTEC e ágar MacConkey para *Enterococci*, *E. coli* e *Aeromonas* sp., respectivamente.

Após a contagem, as colônias típicas de cada bactéria (*E. coli*, *Enterococcus* sp. e *Aeromonas* sp.) foram isoladas e identificadas por testes bioquímicos. Os resultados foram expressos em unidades de formação de colônias (UFC)

por 100mL para amostras de água, e unidades de formação de colônias (UFC) por 100g de amostras de areia ou mexilhão.

Teste de susceptibilidade antimicrobiana

Os testes de sensibilidade microbiana foram realizados pelo método de difusão em disco de ágar de Kirby-Bauer, utilizando ágar de Müller-Hinton e seguindo o Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico²¹. As colônias foram selecionadas aleatoriamente dos isolados, para os seguintes antimicrobianos: i) *Enterococcus* sp.: Ampicilina 10µg, Ciprofloxacina 5µg, Eritromicina 15µg, Gentamicina 10mg, Vancomicina 30µg, Penicilina 10µg e Estreptomina 10µg. ii) *E. coli*: Eritromicina 15µg, Amoxicilina + ácido clavulânico 30µg, Vancomicina 30 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Levofloxacina 5µg, Norfloxacina 10µg e Fosfomicina 200µg. iii) *Aeromonas* sp.: Norfloxacina 10 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Gentamicina 10 µg, Cefalotina 30 µg, Tetraciclina 30 µg, Cefuroxima 30 µg e Ceftriaxona 30 µg. As cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ATCC 35218 foram utilizadas como controles para os resultados seguindo os critérios estabelecidos pelo Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico²¹.

RESULTADOS

As densidades médias para *Enterococcus* sp., *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp. estão listadas na Tabela 1. É possível observar que as densidades de *Enterococcus* de todas as amostras foram maiores em Santos (212 UFC.mL⁻¹ para água, 2354 UFC g⁻¹ para sedimento e 18181 UFC g⁻¹ para mexilhões) do que em Itanhaém (164 UFC. mL⁻¹ para água, 90 UFC g⁻¹ para sedimento e 13272 UFC g⁻¹ para mexilhões), porém não para *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp. Para as três bactérias, observou-se maior densidade nos mexilhões. Além disso, quando os compartimentos utilizados para monitorar a qualidade da praia foram comparados, observaram-se densidades muito maiores nos sedimentos com 2354 UFC g⁻¹ e 90 UFC g⁻¹ para *Enterococcus*; 109 UFC g⁻¹ e 209 UFC g⁻¹ para *E. coli*; 2008 UFC g⁻¹ e 6536 UFC g⁻¹ para *Aeromonas* em Santos e Itanhaém, respectivamente. Ao comparar todas as bactérias

nos três compartimentos, é possível notar que maiores densidades de *Enterococcus* para quase todas as amostras foram encontradas, seguidas por *Aeromonas* e *E. coli*.

Em relação à resistência bacteriana de cepas de *Enterococcus* isoladas de amostras de Santos, o presente estudo mostrou uma resistência de 61,90% em água, 54,00% em sedimento e 47,00% em amostras de mexilhão. Em Itanhaém, a resistência de *Enterococcus* foi de 37,50% em água, 14,20% em sedimento e 57,10% em amostras de mexilhão (Fig.2). A resistência de *Escherichia coli* das amostras de Santos mostrou-se 21,40% na água, 26,50% no sedimento e nenhuma resistência nas amostras de mexilhão. A partir das amostras de Itanhaém, a porcentagem de resistência foi de 42,90% em água, 12,90% em sedimento e 42,90% em amostras de mexilhão (Fig. 2).

Além disso, a porcentagem de resistência de *Aeromonas* das amostras de Santos observada foi de 56,70% em água, 23,80% em sedimento e 42,30% em mexilhão. A partir das amostras de Itanhaém, a porcentagem de resistência foi de 53,00% em água, 4,80% em sedimento e 28,50% em amostras de mexilhão (Fig. 3).

A resistência múltipla é a resistência antimicrobiana demonstrada por um microorganismo para múltiplos antibióticos e, conseqüentemente, representa uma ameaça para a saúde pública. Foram observadas cepas bacterianas com múltiplas resistências aos antibióticos nas amostras de Santos e Itanhaém. As cepas isoladas das águas de Itanhaém apresentaram resistência de 29% a 3 antibióticos, 17% a 2 antibióticos em sedimentos, e 33% a 3 antibióticos em mexilhões.

Em amostras de água de Santos, 44,4% de *Enterococcus* sp. as cepas apresentaram resistência a 4 antibióticos e 22,2% a 6 antibióticos, enquanto que no sedimento, 40% dos isolados eram resistentes a 6 antibióticos e 30% a 3 antibióticos. Além disso, 40% das cepas dos mexilhões eram resistentes a 3 antibióticos e 30% a 4. Em relação a *E. coli*, as cepas isoladas da água e dos sedimentos apresentavam múltiplas resistências com 75% de cepas de água resistentes a 2 antibióticos e 29% de cepas de sedimentos resistentes a 3 antibióticos. Nas amostras de mexilhão, a resistência múltipla não foi observada. Para *Aeromonas* sp. em Santos, 55% das cepas isoladas da água apresentaram resistência a 4 antibióticos, 17% das cepas isoladas da areia

apresentaram resistência a 5 antibióticos e 75% das cepas isoladas dos mexilhões apresentaram resistência a 3 antibióticos.

Em relação aos antibióticos testados, *Enterococcus* sp. isolados das amostras de água de Itanhaém apresentaram maior resistência a Gentamicina (28%), Eritromicina (27%) e Estreptomina (27%) (Fig. 4) e os isolados das amostras de água de Santos apresentaram maior resistência à Eritromicina (23%) e a Penicilina (21%). No sedimento, observou-se maior resistência a Estreptomina (40%), Gentamicina (24%), Ciprofloxacina (21%) e Estreptomina (21%) das amostras de Itanhaém e Santos, respectivamente. A partir das amostras de mexilhão em Itanhaém, Estreptomina (25%) e Eritromicina (25%) apresentaram a maior taxa de resistência, e nas amostras de Santos elas foram mais resistentes a Eritromicina (28%), Estreptomina (24%) e Gentamicina (24%) (Fig. 4).

As cepas de *Escherichia coli* das amostras de água mostraram resistência à Vancomicina e Eritromicina em 33% dos isolados em Itanhaém

e 50% em Santos (Fig. 5). As amostras de sedimento apresentaram cepas resistentes a Fosfomicina (44%), Eritromicina (28%) e Amoxicilina + ácido clavulânico (28%) em Itanhaém e Vancomicina (46%) e Fosfomicina (31%) nas amostras de Santos (Fig.5). Em amostras de mexilhão de Itanhaém 33% foram resistentes a Vancomicina e Eritromicina, mas não foi observada resistência nas amostras de Santos.

Em relação às cepas de *Aeromonas* sp. isoladas de água, porcentagens altas de resistência foram relacionadas com Cefalotina (27%, 25% em Itanhaém e Santos, respectivamente) e Cefuroxima (27%, 22% em Itanhaém e Santos, respectivamente). Em amostras de sedimentos de Itanhaém, 50% eram cepas resistentes a Cefalotina e Cefuroxima, e de Santos, 60% das cepas apresentaram resistência a Cefalotina (Fig. 6). Em amostras de mexilhão de Itanhaém, observou-se maior resistência em relação a Cefalotina (50%), Tetraciclina (28%) e Cefuroxima (22%), e de Santos para Cefuroxima (34%) e Tetraciclina (30%).

Tabela 1 – Densidades médias de *Enterococcus* sp., *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp. de amostras de água (UFC.mL⁻¹), sedimento (UFC.g⁻¹) e mexilhão (UFC.g⁻¹) em Santos e Itanhaém, Estado de São Paulo (fevereiro de 2016.)

	Santos			Itanhaém		
	água	sedimento	mexilhão	água	sedimento	mexilhão
<i>Enterococcus</i> sp	212	2354	18181	164	90	13272
<i>Escherichia coli</i>	2	109	5090	76	209	1363
<i>Aeromonas</i> sp	28	2008	8318	170	6536	818

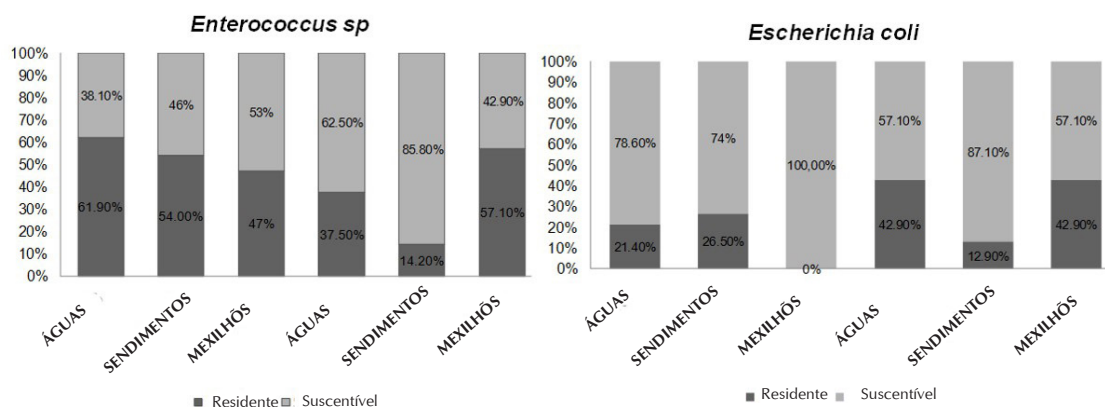


Figura 2 – Porcentagem de cepas resistentes de *Enterococcus* sp. e de *Escherichia coli* em amostras de Santos (SP) e Itanhaém (SP) (fevereiro de 2016).

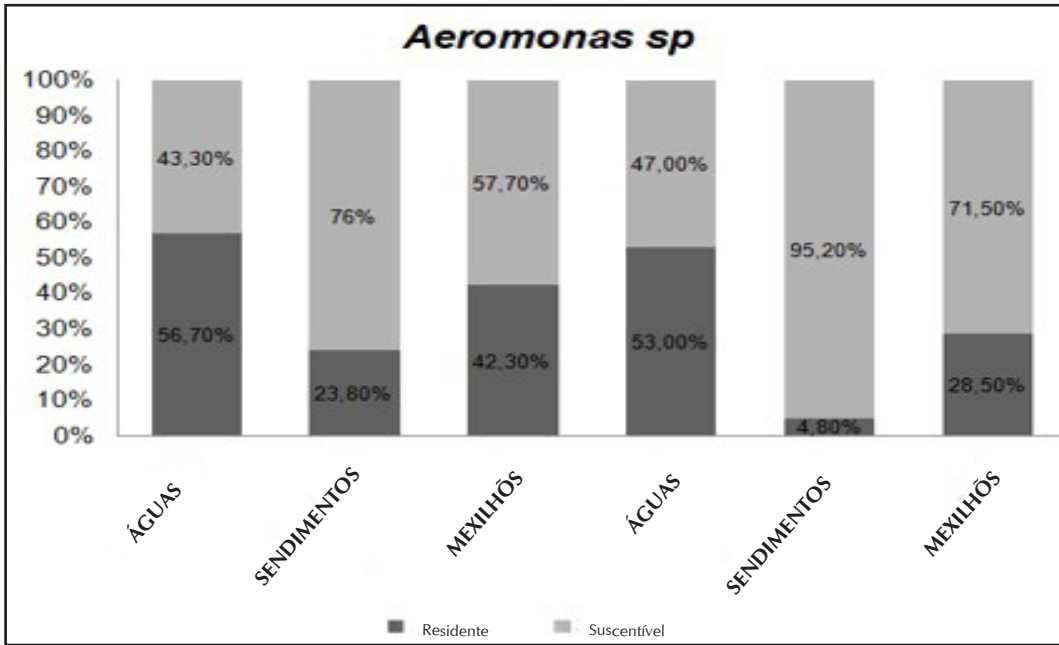


Figura 3 – Porcentagem de cepas resistentes de *Aeromonas* em amostras de Santos (S) e Itanhaém (I), Estado de São Paulo (fevereiro de 2016).

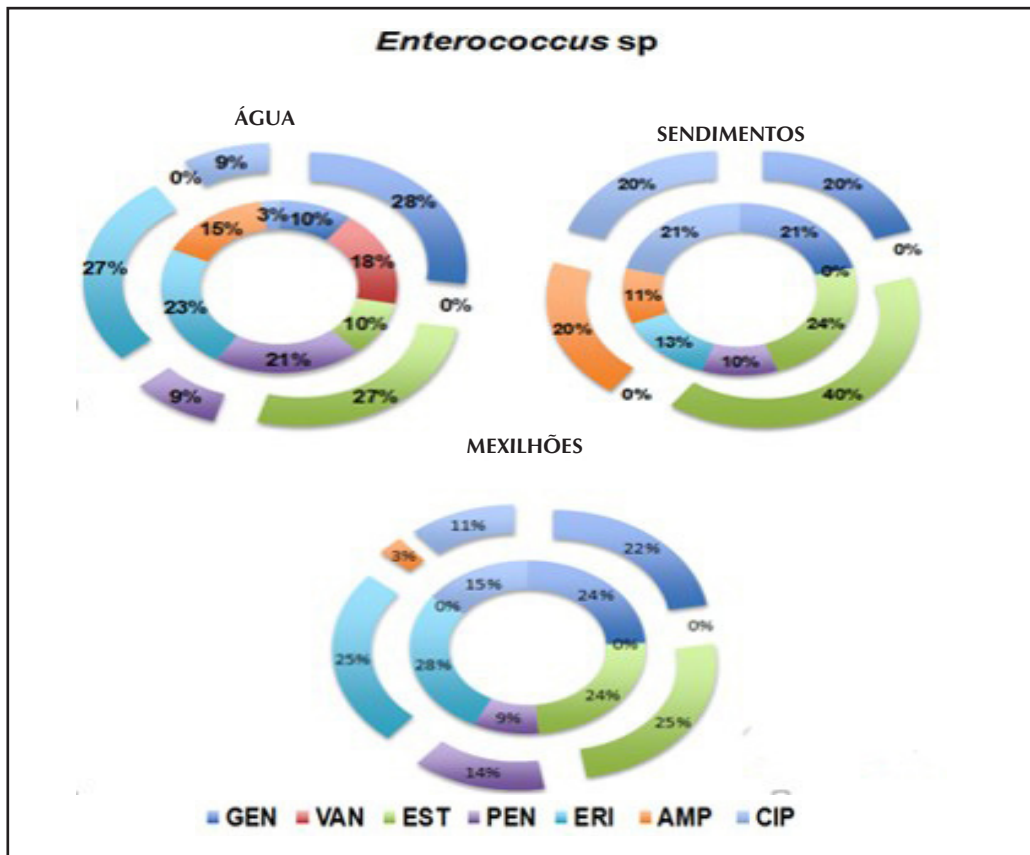


Figure 4 – Porcentagem de resistência de *Enterococcus sp.* de acordo com agentes antimicrobianos, círculo externo - amostras de Itanhaém (fevereiro de 2016); círculo interno - amostras de Santos (fevereiro de 2016) onde: GEN- Gentamicina; VAN- Vancomicina; EST-Estreptomicina; PEN-Penicilina; ERI- Eritromicina; AMP- Ampicilina; CIP-Ciprofloxacina.

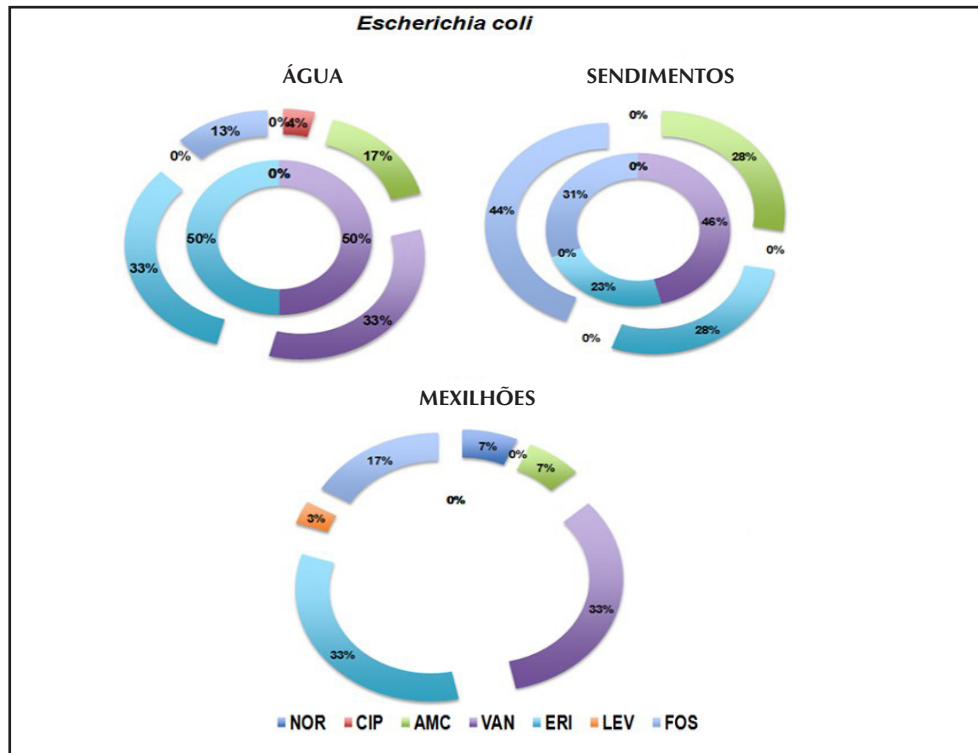


Figura 5 – Porcentagem de resistência de *E. coli* de acordo com agentes antimicrobianos, círculo externo - amostras de Itanhaém (fevereiro de 2016); círculo interno - amostras de Santos (fevereiro de 2016), onde: NOR- Norfloxacina; CIP- Ciprofloxacina; AMC- Amoxicilina + ácido clavulânico; VAN- Vancomicina; ERI- Eritromicina; LEV- Levofloxacina; FOS- Fosfomicina.

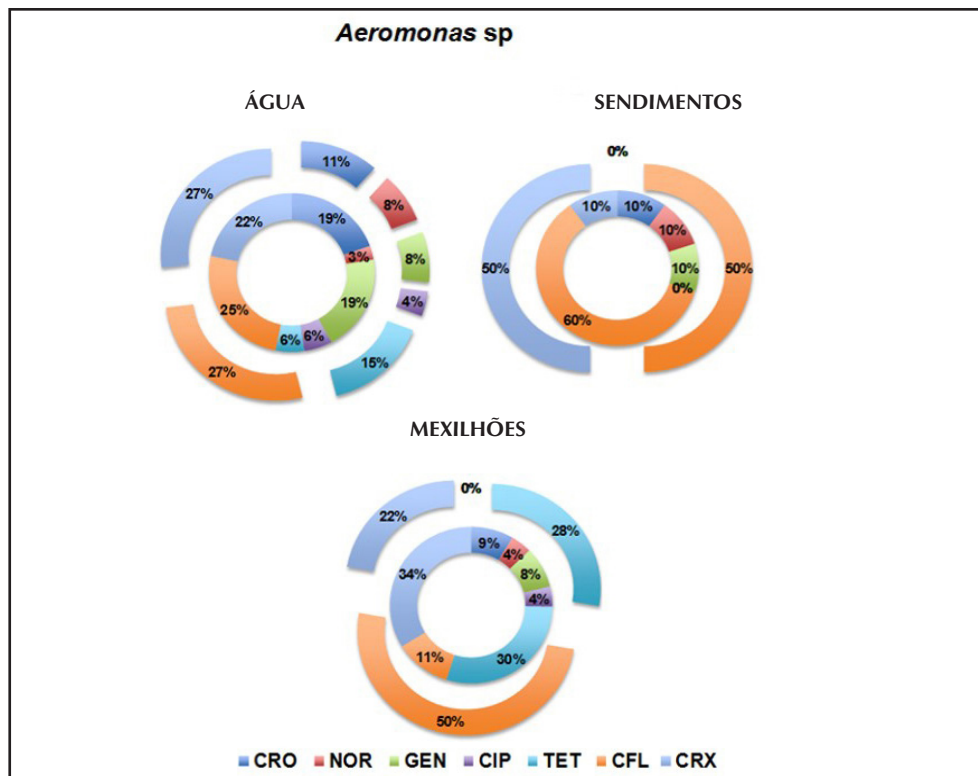


Figura 6 – Porcentagem da resistência *Aeromonas sp.* de acordo com agentes antimicrobianos, círculo externo - amostras de Itanhaém (fevereiro de 2016); círculo interno - amostras de Santos (fevereiro de 2016), onde: CRO- Ceftriaxona; NOR- Norfloxacina; GEN- Gentamicina; CIP- Ciprofloxacina; TET- Tetraciclina; CFL- Cefalotina; CRX- Cefuroxima;

DISCUSSÃO

É conhecido pela comunidade científica que existem diversas populações de bactérias patogênicas na água e areia da praia²². As densidades de inúmeras bactérias patogênicas podem levar a possíveis repercussões na saúde pública²³. É muito importante monitorar bactérias patogênicas em áreas de praia porque a propagação da poluição nas zonas de banho está diretamente ligada à saúde dos banhistas de mar, tornando a poluição um importante problema de saúde pública²⁴.

Portanto, de acordo com a legislação brasileira²⁵, é considerado apropriado para o banho praias que apresentam uma densidade de *Enterococcus* até 400 UFC 100mL⁻¹ e 2000 UFC 100mL⁻¹ de *Escherichia coli* em uma única amostra de água. Alternativamente, quando 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cinco semanas, coletadas no mesmo local, possuem um máximo de 800 *Escherichia coli* ou 100 *Enterococcus* por 100 mililitros. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a água coletada em Santos e Itanhaém é adequada para o banho.

Observou-se que as densidades de *Enterococcus* sp. nas águas coletadas em Santos foram superiores às obtidas para Itanhaém. No entanto, não foi observado o mesmo para *E. coli* e *Aeromonas* sp., mesmo quando a Itanhaém é considerada uma praia com melhor qualidade ambiental. Uma razão que pode explicar esse fato é a possível presença de fontes difusas de contaminação perto do local de coleta em Itanhaém.

Além disso, os resultados mostraram valores muito elevados para *E. coli*, *Enterococcus* e *Aeromonas* no sedimento para as duas áreas. Embora a legislação brasileira recomende a medição de indicadores presentes na areia, esse monitoramento é feito apenas na água na maior parte do país²⁰. De acordo com Davies - Colley¹⁰ estudos mostraram que os indicadores fecais na água do mar sofrem inativação causada por raios solares e estão expostas as ações dos bacteriófagos, baixo teor de nutrientes, predação e competição com organismos nativos. Por esta razão, as areias das praias atuam como protetores de tais microorganismos. Na verdade, a areia da praia constitui um ambiente protetor que permite a sobrevivência dessas bactérias, pois podem aderir às partículas sedimentares⁶. Além disso,

grandes quantidades de detritos orgânicos são encontradas aderidas no sedimento, permitindo a sobrevivência dessas bactérias por longos períodos²⁶.

Portanto, são esperadas maiores densidades de bactérias no sedimento quando comparadas à água, e nesse sedimento há melhores indicadores para praias com contaminação crônica. Se o monitoramento da areia do Rio de Janeiro¹⁴ for levado em consideração, de acordo com as densidades de *E. coli* encontradas nas areias das praias, as duas áreas seriam consideradas adequadas para o banho. No entanto, ao analisar as densidades de *Enterococcus* na areia em Santos, é possível ver que o número é muito maior e, como foi mostrado, o *Enterococcus* é um indicador melhor porque é mais resistente à salinidade, dessecação e cloro.

Do mesmo modo, esperava-se densidades de bactérias mais altas nos mexilhões. Os organismos que filtram, concentram densidades maiores de microorganismos quando comparados à coluna de água, causando uma contaminação crônica. A *P. perna* apresenta um grande potencial para acumular bactérias devido ao seu modo de alimentação, e apesar desta capacidade, a relação entre o número de bactérias na coluna de água e as bactérias acumuladas pelo mexilhão não é direta e depende de muitos fatores¹².

Monitorar a contaminação dos mexilhões pode ser importante para as ações preventivas em saúde pública, particularmente no que diz respeito ao consumo de mexilhões como frutos do mar. A instrução padrão que regula os padrões microbianos no marisco é a resolução da agência nacional de vigilância sanitária, ANVISA, RDC nº 12/01. Embora pertençam ao meio marinho, peixes, mexilhões, crustáceos e outros organismos utilizados como alimentos, têm sua avaliação de qualidade microbiológica baseada apenas em densidades de coliformes, *Estafilococos* e *Salmonella* sp.¹¹. Além disso, como demonstrado no presente estudo, *E. coli*, *Enterococcus* e *Aeromonas* são indicadores importantes de contaminação no ambiente marinho, como foi observado para água e sedimentos, e acabam se concentrando excessivamente nestes organismos marinhos. Desta forma, essas bactérias podem ser indicadores importantes de contaminação crônica em frutos do mar. Quando estas bactérias patogênicas são encontradas em todos os compartimentos da praia e são resistentes aos antibióticos, esse problema pode ser agravado.

No presente estudo, os resultados mostraram

uma porcentagem representativa de *Aeromonas*, *Enterococcus* e *E. coli* resistentes nas duas áreas de estudo de água, sedimento e mexilhão. O uso excessivo e descontrolado de antibióticos em diferentes ambientes resultou na seleção de bactérias resistentes²⁷. A descarga de efluentes de esgotos hospitalares e urbanos pobremente tratados, somado ao uso intensivo de antibióticos na aquicultura e na produção animal podem ser alguns dos motivos para a presença dessas bactérias resistentes em alimentos, animais e água⁷.

Estudos recentes²⁸ também isolaram um grande número de bactérias patogênicas, como *Aeromonas*, *Enterococcus* e *E. coli*, demonstrando que isso é uma questão importante em todo o mundo. Os resultados mostraram que as taxas de resistência foram significativamente maiores nas praias que receberam insumos antropogênicos. Itanhaém e Santos são cidades que têm descarga de esgoto diretamente no mar, favorecendo o isolamento de um número representativo de cepas resistentes.

Mesmo quando de acordo com a legislação, as densidades de bactérias patogênicas demonstraram que as praias eram adequadas para o banho, umas porcentagens significativas de cepas resistentes a antibióticos foram encontradas. Estudos recentes relacionaram os resultados de saúde humana com o aumento da incidência de doenças gastrointestinais e diarreia entre os frequentadores das praias na Flórida que passaram mais tempo em areia úmida⁵ e entre os frequentadores das praias que estavam envolvidos em atividades de contato com areia (cavando areia, enterrados em areia)⁶. Quando essas bactérias são resistentes ao tratamento antibiótico, esse problema de saúde pública torna-se muito mais difícil de resolver.

Ao longo dos anos, a resistência às cefalosporinas entre os membros de Enterobacteriaceae aumentou principalmente devido a disseminação de B-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e outros antibióticos²⁹. O presente estudo corrobora esse resultado, já que um número significativo de *E. coli* resistentes à Vancomicina, Eritromicina e Fosfomicina foram isolados. Desta forma, o tratamento para infecções por *E. coli* tem sido cada vez mais complicado pelo surgimento de resistência à maioria dos agentes antimicrobianos de primeira linha³⁰.

Um estudo de Kristich (2014)³¹ mostra que os aminoglicosídeos agem por ligação ao RNAr 16S da subunidade ribossômica 30S e interferem

na síntese protéica. Os enterococos geralmente exibem um nível moderado de resistência a aminoglicosídeos. O mesmo foi encontrado neste estudo, uma vez que um número representativo de cepas resistentes a Estreptomicina e Gentamicina foram isoladas. Isso é preocupante devido ao fato de que o tratamento de infecções enterocócicas se tornou um dos problemas mais desafiantes que os clínicos enfrentam no século XXI. O aumento da prevalência de cepas resistentes a quase todos os antibióticos com atividade bactericida in vitro contra enterococos é uma tendência alarmante³¹.

O uso de antibióticos é um dos fatores mais importantes que influenciam o surgimento de resistência em patógenos bacterianos. *Aeromonas* multiresistentes foram isolados de diferentes partes do mundo e são relatados como resistentes à Penicilina e Ampicilina, mas sensíveis aos Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Cloranfenicol, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Quinolonas e Cefalosporinas de segunda e terceira geração³².

Desta forma, foram observadas densidades maiores dessas bactérias patogênicas, especialmente em sedimentos e mexilhões, e uma parte representativa dessas cepas foi resistente a muitos antibióticos. Isso mostra a importância de melhorar o monitoramento do meio ambiente costeiro, uma vez que grande parte da população usa essas áreas e acaba sendo exposta a agentes patogênicos resistentes.

É necessário um programa de monitoramento severo para as áreas costeiras brasileiras, como o tratamento de esgoto; eliminação correta dos emissários; educação ambiental; recolhimento de resíduos e outros, para minimizar tais impactos. Além disso, é necessário criar ou melhorar padrões para monitorar os sedimentos e melhorar a supervisão dos frutos do mar consumidos pela população.

CONCLUSÃO

As amostras de sedimentos apresentaram maiores densidades bacterianas e uma maior proporção de cepas resistentes quando comparadas às encontradas em amostras de água, provavelmente devido as suas características inerentes (e.g., condições favoráveis de nutrientes, proteção solar e proteção contra predação). Isso representa uma ameaça séria à saúde pública, uma vez que os banhistas passam a maior parte do tempo na areia ao invés da água, sendo assim mais expostos aos microorganismos. Por

sua vez, os mexilhões apresentaram maiores densidades bacterianas quando comparados aos outros compartimentos. Isto é provavelmente devido ao fato de que eles são organismos que filtram, acumulando matéria suspensa em seus tecidos, incluindo microorganismos. Dos três microrganismos estudados, *Enterococcus* sp. apresentou maiores densidades, possivelmente porque é um microorganismo mais resistente às condições marinhas. Políticas públicas, leis e programas de monitoramento mais eficientes devem ser focadas nas areias e moluscos, bem como considerar a análise de *Enterococcus* sp. como um indicador importante.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Guidelines for Safe Recreational waters – Water Environments. Volume 1: Coastal and Fresh-Waters. WHO/EOS/98.14, World Health Organization, Geneva, 1998; 208p.
2. Pinhata JMW, Oliveira AJFC. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research*, 2008; 42:2242-2250.
3. Afifi S, Elmanama A, Shubair M. Microbiological assessment of beach quality in Gaza Strip. *Egypt. J. Med. Lab. Sci.*, 2000; 9.
4. Bonilla TD, Nowosielski K, Cuvelier M, Hartz A, Green M, Esiobu N, et al. Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 2007; 54:1472-82.
5. Heaney CD, Sams E, Dufour AP, Brenner KP, Haugland RA, Chern E, et al. Fecal indicators in sand, sand contact, and risk of enteric illness among beachgoers. *Epidemiology*, 2012; 23:95-106.
6. Andrade VC, Zampieri BDB, Ballesteros ER, Pinto AB, Oliveira AJFC. Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands. *Environmental Monitoring Assessment*, 2015; 187:342.
7. Davies-Colley RJ, Donnison AM, Speed DJ, Ross CM, Nagels JW. Inactivation of fecal indicator microorganisms in waste stabilization ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Research*, 1999; 33(5):1220-1230.
8. Davies CM, Bavor HJ. The fate of storm water associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. *Journal of Applied Microbiology*, 2000; 89(2):349-360.
9. Martinez DI, Oliveira AJFC. Faecal bacteria in Pernaperna (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) for biomonitoring coastal waters and seafood quality. *Brazilian Journal of Oceanography*, 2010; 58(3).
10. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução 274. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 25 jan. 2001. Seção 1, n. 18, p. 70-71.
11. SÃO PAULO. Lei nº 14.366, 15 de março de 2011. Inclui no monitoramento das Praias a análise periódica da qualidade da areia das praias do litoral, dos rios e represas do estado de São Paulo. *Diário Oficial, São Paulo*, 2011.
12. Crescreek MC, Petroni RGG, Cortez FS, Santos AR, Coutinho PO, Pusceddu FH. Análise da qualidade sanitária da areia das praias de Santos, litoral do estado de São Paulo. *Eng Sanit Ambient*, 2016; 21(4): 777-782.
13. Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SMAC). Resolução SMAC nº 468, de 28 de janeiro de 2010. Dispõe sobre a análise e informações das condições das areias das praias no Município do Rio de Janeiro. *Diário Oficial do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ*, 29 jan. 2010. Ano XXIII, nº 211.
14. Kühn I, Iversen A, Burman LG, Olsson-Liljequist B, Franklin A, Finn M, Aarestup F, Seyfarth AM, Blanch AR, Taylor H, Caplin J, Moreno MA, 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.*, 2000; 14(4):337-342.
15. Abessa DMS, Rachid BR, Moser GAO, Oliveira AJFC. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos. *O Mundo da Saúde*, 2012; 36: 643-661.
16. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo, 2015.
17. American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA, AWWA, WEF. 22th Edition, 2012.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Second ed., 2010.
19. Heaney CD, Exum NG, Dufour AP, Brenner KP, Haugland RA, Chern E, Schwab KJ, Love DC, Serre ML, Noble R, Wade TJ. Water quality, weather and environmental factors associated with fecal indicator organism density in beach sand at two recreational marine beaches. *Science of the Total Environment*, 2014; 1: 440-447. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.113.
20. Halliday E, Gast RJ. Bacteria in beach sands: an emerging challenge in protecting coastal water quality and bather health. *Environmental Science & Technology* 2011; 45(2): 370-379. doi:10.1021/es102747s.
21. Lee JL, Kim IH, Yeon YJ, Lee J. Monitoring and analysis of bacterial communities during a summer season on Gyeongpo Beach. In: Lee, J.L.; Griffiths, T.; Lotan, A.; Suh, K.-S., and Lee, J. (eds.), *The 2nd International Water Safety Symposium*. *Journal of Coastal Research, Special Issue* 2017; 79: 249-253.
22. Ghinsberg RC, Leibowitz P, Witkin H, Mates A, Seinberg Y, Bar DL, et al. Monitoring selected bacteria and fungi in sand and seawater along Tel Aviv coast. *MAP Tech Rep Ser.* 1994;87:65-81.
23. Pinto AB, Pereira CR, Oliveira AJFC. 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*, 2012; 587-593.
24. Kümmerer, K. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004; 54:311-320.
25. Smaldone G, Marrone R, Cappiello S, Martin GA, Oliva G, Cortesi ML, Anastasio A. Occurrence of antibiotic resistance in bacteria isolated from seawater organisms caught in Campania Region: preliminary study. *BMC Vet Res.*, 2014;10:161.
26. Alouache O, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C, Bahour R. Antibiotic Resistance and Extended-Spectrum B-Lactamases in

Isolated Bacteria from Seawater of Algiers Beaches (Algeria). *Microbes and Environments*. 2012; 27(1):80-86.

27. Yusha'u M, Umar MI, Suleiman K. Indigenous commercial drinks as potential sources of extended spectrum B-lactamases (ESBLs) producing organisms in Kano, Nigeria. *Int J Biomed Health Sci*. 2010; 6:103-8.

28. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

29. Stratev D, Odeyemi OA. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 2016; 9:535-544.

30. Sabaté M, Prats G, Moreno E, Ballesté E, Blanch AR, Andreu A. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Research in Microbiology*, 2008; 159:288-93.

31. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

32. Stratev D, Odeyemi OA. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 2016; 9:535-544.