

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE AREIAS RECREACIONAIS DE CRECHES
E PRAÇAS PÚBLICAS DE SANTA MARIA – RS¹.**

Microbiology quality of playgrounds sandbox in Santa Maria city, RS

Rita Denise Niederauer Weiss¹, Rosane Salete C. Friedrich², Bernadete Rocha Martins¹, Kátia Cristina de Paula¹, Lúcia Helena Niederauer Weiss¹, Heloísa Smaniotto³, Carlos Flávio B. da Silva³

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo investigar a qualidade microbiológica de areias recreacionais na cidade de Santa Maria – RS e verificar o perfil de sensibilidade de *Escherichia coli* isoladas dessas areias. Foram analisadas amostras da areia de 14 creches e 13 praças públicas da cidade de Santa Maria. A quantificação dos microrganismos mesófilos aeróbios (bactérias heterotróficas) foi feita através da contagem do número de unidades formadoras de colônias por grama de areia (UFC/g). A contagem de coliformes totais e fecais foi feita pelo método do Número Mais Provável (NMP). A confirmação da presença de *Escherichia coli* foi realizada a partir do crescimento de coliformes fecais no caldo EC e confirmada pelo teste IMViC. Para realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos foi utilizado o método de difusão em ágar Müller-Hinton, de acordo com Kirby-Bauer. Os resultados mostraram elevada contagem de bactérias heterotróficas, associada à presença de coliformes totais e fecais em todas as amostras. Em apenas uma amostra não foi confirmada a presença de *E. coli*. As amostras de *E. coli* foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos. Pelos resultados obtidos demonstrou-se a contaminação das areias com bactérias patogênicas e seu consequente risco à saúde da população que, direta ou indiretamente, entrar em contato com esta areia. Não foi encontrada nenhuma amostra de *E. coli* multiresistente aos antimicrobianos avaliados.

Palavras-chave: Coliformes fecais, *Escherichia coli*, microbiologia ambiental.

SUMMARY

This research evaluated the microbiologic quality of playground sandboxes in Santa Maria city, RS, Brazil. The sensibility profile of *Escherichia coli* strains isolated from the sand was also determined. Samples of sandboxes from 14 day-care center and 13 public squares located at the down town and suburbs of Santa Maria were analyzed. The mesophilic aerobic bacteria (heterotrophic aerobic bacteria) were quantified by the counting of the number of colony-forming units per gram of sand (CFU/g). The total and fecal coliforms were quantified by the Most Probable Number test (MPN). The presence of *E. coli* was detected by growth of fecal coliforms in EC broth and confirmed by the IMViC test. The susceptibility tests were performed by the diffusion in Müller-Hinton agar according to Kirby-Bauer method, employing commercial disks. The results demonstrated a high counting of mesophilic aerobic bacteria associated with the presence of total and fecal coliforms in all samples of sand. Only one sample did not confirm the presence of *E. coli*. The *E. coli* strains showed a high sensibility to most tested drugs. These results showed the contamination of sandboxes sands with pathogenic bacteria and the risks to the population that come in contact with the sand. No sample of *E. coli* multiresistent to the test drugs was detected.

Keywords: fecal coliforms, *Escherichia coli*, ambiental microbiology.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Análises Microbiológicas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Av. Roraima, 1000, Campus Universitário Camobi, Prédio 20, Sala 4215, CEP 97105-900. RS, Brasil.

¹Médica Veterinária

²Farmacêutica Bioquímica

³Vigilância Sanitária, Secretaria de Saúde Prefeitura Municipal de Santa Maria

INTRODUÇÃO

A microbiologia sanitária é responsável pelo monitoramento e a detecção de microrganismos causadores de doença^{1,2}. O controle de qualidade do meio ambiente está principalmente relacionado com a qualidade microbiológica, sendo este um parâmetro utilizado para avaliar os riscos a saúde associados com bactérias³. A detecção e enumeração de organismos indicadores são de grande importância para verificar a presença desses microrganismos. Este critério de qualidade é usado para medir o risco de se contrair várias doenças associadas ao contato com areia⁴. Entre os microrganismos mais frequentes podemos citar membros da família Enterobacteriaceae, representados principalmente, por *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* *Salmonella sp.* que são utilizados como indicadores de contaminação por fezes humanas e/ou animais¹.

Sedimentos de areia retêm bactérias por adsorção no seu substrato, carregando junto de si os contaminantes e poluentes⁵. O contato direto de areias contaminadas com o homem, principalmente crianças, que são mais suscetíveis a agentes patogênicos, é um fator de risco. Pesquisas epidemiológicas para relacionar a presença de microrganismos com infecções entéricas e não entéricas resultou em correlação positiva⁶.

Embora a identificação das fontes de poluição fecal em vias urbanas seja frequentemente difícil⁵, no campo da Saúde Pública torna-se necessário quantificar e identificar alguns microrganismos reconhecidamente responsáveis por surtos, ou mesmo casos isolados, de infecções e/ou toxinfecções.

Este aspecto é importante do ponto de vista epidemiológico, tendo em vista a resistência especialmente dos enteropatógenos, às variações de temperatura, radiações e outros fatores de natureza físico-química⁷.

Estas características assumem particular interesse em áreas de recreação infantil, onde a possibilidade de veiculação desses agentes é facilitada pelo contato direto dos usuários com a superfície do solo⁸.

O aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos vem crescendo devido, principalmente, ao uso indiscriminado e constante de antibacterianos em medicina humana e veterinária⁹. O desenvolvimento dessa resistência, além de reduzir a eficácia da droga, também representa um potencial de risco à saúde pública, uma vez que o contato dos homens com animais pode aumentar a ocorrência de resistência na microbiota desta espécie¹⁰.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a qualidade microbiológica das areias recreacionais, já que até o momento foram confirmadas somente contaminações por helmintos e protozoários.

A resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) n° 274 de 29 de novembro de 2000, em seu artigo 8°,

recomenda aos órgãos ambientais a avaliação das condições parasitológicas e microbiológicas da areia de praias para futuras padronizações. Não existem padrões ou limites estabelecidos pela legislação brasileira para areias, nem de praias nem recreacionais. Atualmente o que se tem utilizado são os valores propostos por pesquisadores portugueses, no Guideline for Microbiological Quality of Sands, (Número Mais Provável por grama de areia seca: coliformes totais: 10^4 e coliformes fecais: 10^3)¹¹.

Também se avaliou o perfil de susceptibilidade, como marcador epidemiológico, de *Escherichia coli* isoladas destas areias recreacionais

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras da areia de 14 creches e 13 praças públicas localizadas em regiões centrais e periféricas da cidade de Santa Maria.

As amostras de aproximadamente 300g foram coletadas em frascos estéreis. Dessas amostras foram retiradas 25g, imediatamente suspensas em 225 mL de salina tamponada estéril e a seguir retirou-se 1 mL para as diluições necessárias.

A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (MA) é baseada na premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra forma uma colônia visível e isolada em meio de cultura sólida, fazendo-se assim a contagem do número de unidades formadoras de colônias por grama de areia (UFC/g). Para contagem de microrganismos aeróbios foram semeados 0,1 mL das diluições seriadas em ágar padrão contagem (PCA).

A contagem de coliformes totais (CT) e coliformes fecais (CF) foi realizada pelo método do Número Mais Provável (NMP)¹². A partir de cada diluição (no mínimo de três diluições) retirou-se 1 ml que foi inoculado em uma série de cinco tubos contendo caldo lauril sulfato triptose com tubos de Durhan invertidos no seu interior, que foram incubados por 24 a 48 horas em estufa à temperatura de 35°C. Daqueles tubos onde ocorreu crescimento de microrganismos com produção de gás, retirou-se uma alíquota, a qual foi inoculada no caldo verde brilhante com tubos de Durhan invertidos e incubados em estufa a 35°C por 24 a 48 horas. A partir de tubos que evidenciaram crescimento e produção de gás, foi retirada uma alíquota de material e que foi inoculado no caldo EC com tubos de Durhan invertidos; a incubação foi a 44,5 - 45,5°C em banho-maria por 24 a 48 horas, quando se observava o crescimento e a produção de gás.

A contagem de coliformes totais (CT) foi baseada no número de tubos de caldo verde brilhante com crescimento e produção de gás nas diferentes diluições e assim determinado o número mais

provável de CT por grama de areia.

A contagem de coliformes fecais (CF) foi realizada a partir dos tubos contendo caldo EC que, após incubação no banho-maria 44,5 - 45,5°C, evidenciaram crescimento com produção de gás e, da mesma forma, comparados com tabela apropriada às diluições utilizadas para a determinação do número mais provável de CF por grama de areia (NMP/g).

A presença de *Escherichia coli* foi confirmada a partir do crescimento de coliformes fecais. Era retirada uma alíquota dos tubos com crescimento e produção de gás e semeada em placas de Petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno onde era observado o crescimento de colônias de aspecto metálico, características de *E. coli*; a seguir estas colônias foram identificadas utilizando-se provas bioquímicas: teste do indol, teste de vermelho de metila, teste de Voges-Proskauer e utilização do citrato (IMViC)¹³.

Simultaneamente a estes isolamentos e quantificações, foi também pesquisada a presença de outros microrganismos responsáveis por infecções, intoxicações ou toxinfecções, como *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp.,

Aeromonas sp, *Moraxella* sp, *Acinetobacter* sp e membros da família *Enterobacteriaceae*.

Para realização dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foi utilizado o método de difusão em ágar Müller-Hinton segundo técnica descrita por Bauer *et al*². As amostras de *E. coli* foram testadas frente a ampicilina, imipenem, cefalotina, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina e ampicilina + sulbactam. Os antimicrobianos usados foram escolhidos segundo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2003).

RESULTADOS

Os resultados obtidos evidenciaram elevada contagem de bactérias heterotróficas, associada à presença de coliformes totais e fecais em todas as amostras (Tabela I). Em apenas uma amostra não foi confirmada a presença de *E. coli* (Tabela I).

TABELA I – Média aritmética de bactérias mesófilas aeróbias (MA), coliformes totais (CT), coliformes fecais (CF) e porcentagem de amostras com *Escherichia coli* resultante do monitoramento microbiológico de areias recreacionais de Santa Maria, RS no período de setembro de 2000 a março de 2003.

Local de Coleta	MA (UFC/g)	CT (CT/g)	CF (CF/g)	<i>E. coli</i> (%)
Creches (14)	9,5 x 10 ⁵	8,0 x 10 ³	0,6 x 10 ³	92,85
Praças (13)	6,1 x 10 ⁵	1,5 x 10 ³	0,8 x 10 ³	100

Diversos foram os microrganismos mesófilos aeróbios isolados (Tabela II), sendo os mais frequentes *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Klebsiella* sp. e *Citrobacter* sp. As amostras testadas demonstraram boa sensibilidade a maioria dos antimicrobianos testados, sendo 100% sensíveis a gentamicina,

imipenem e ciprofloxacina; enquanto que a maior resistência foi observada frente a ampicilina (89,5%) e a cefalotina (73,7%) (Figura I). A associação de ampicilina com inibidores de b-lactamases foi mais ativa contra *E. coli*, quando comparada à atividade de ampicilina isenta desta associação.

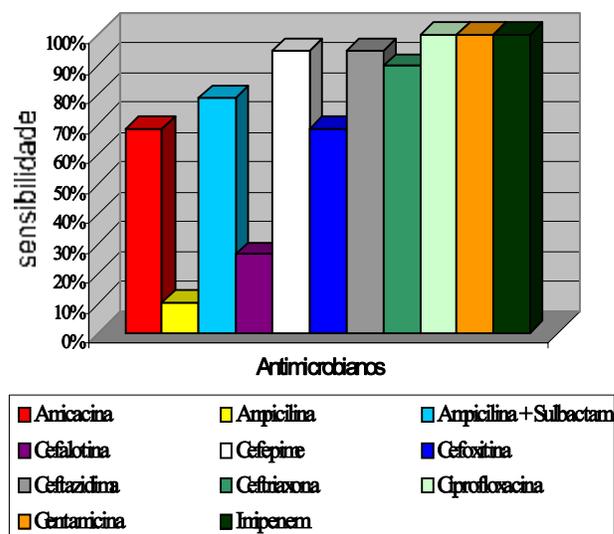


Figura - 1. Perfil de susceptibilidade de *Escherichia coli* isoladas de areias recreacionais na cidade de Santa Maria- RS, no período de setembro de 2000 a março de 2003.

TABELA II– Porcentagem de microrganismos isolados nas areias de creches e praças da cidade de Santa Maria – RS, no período de setembro de 2000 a março de 2003.

MICROORGANISMOS	Creches %	Praças %
<i>Pseudomonas</i> sp.	50	7
<i>Serratia</i> sp.	28	14
<i>Staphylococcus</i> sp.	7	7
<i>Enterobacter</i> sp.	64	50
<i>Klebsiella</i> sp.	36	28
<i>Citrobacter</i> sp.	36	21
<i>Moraxela</i> sp.	7	0
<i>Acinetobacter</i> sp.	7	0
<i>Hafnia</i> sp.	7	0
<i>Aeromonas</i> sp.	0	35
<i>Erwinia</i> sp.	7	7
<i>Butiauxiella</i> sp.	0	7
<i>Providencia</i> sp.	0	7

DISCUSSÃO

A sobrevivência das bactérias no ecossistema das areias é afetado pela quantidade de nutrientes orgânicos, pela presença da microbiota de competição e pela ação de fatores de natureza físico-química⁸. Salienta-se ainda as interferências resultantes das chuvas e ventos, que mecanicamente carregam diferentes microrganismos, inclusive patógenos, para outros locais.

Comparando-se as médias aritméticas de coliformes totais e fecais para creches e praças pode-se observar que a contaminação das praças foi maior, provavelmente reflexo do trânsito constante de animais nesses locais.

Todos os resultados encontrados, tanto em creches quanto em praças, estão acima dos valores sugeridos por pesquisadores portugueses¹¹.

É provável que a maioria dos isolados de *Escherichia coli* tenha origem animal, como aves, cães e gatos com acesso a essas areias. Os animais, diferente dos humanos, não sofrem muita exposição a antimicrobianos, sendo atribuído a este fato a baixa resistência das bactérias aos antimicrobianos testados. A sensibilidade observada poderá ser substituída por cepas resistentes, já que a resistência pode ser transferida por diversos mecanismos e estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de populações diferentes, como o da microbiota humana para animal e vice-versa¹⁴.

Conclui-se através dos resultados obtidos que as areias de recreação analisadas encontravam-se contaminadas com bactérias patogênicas e isto representa risco à saúde da população.

Não foi encontrada nenhuma amostra de *E. coli* multirresistente aos antimicrobianos testados.

Destaca-se a necessidade de uma legislação que regulemente as condições microbiológicas das areias de recreação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hagler AN, Hagler LCSM. Microbiologia Sanitária. In: Roitman I, Travasso LR, Azevedo JL. Tratado de microbiologia. São Paulo: Manole; 1988. P. 83-102.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer J Clin Pathol* 1966 45: 493-496.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia ambiental. In: Microbiologia. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000. p. 714– 26.
- Cabelli VJ, Dufour AP, McCabe LJ, Levin MA. A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. *J Water Poll Contr Fend* 1983; 55: 1306-14.
- Nix PG, Daykin MN, Vilkas KL. Sediment bags as an integrator of fecal contamination in aquatic systems. *Water Research* 1993; 27: 1569-76.
- Marino FJ, Morinigo MA, Martinezmanzanares E, Borrego JJ. Microbiological epidemiologic-study of selected marine beaches in Malaga (Spain). *Water Science and Technology* 1997; (5-6): 5-9.
- Burton GAB, Gunisson D, Lanza GR. Survival of Pathogenic bacteria in various freshwater sea. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 633-8.
- Rodrigues DP, Ribero RV, Hofer E. Enterobactérias patogênicas no solo de áreas de recreação na cidade do Rio de Janeiro – RJ. *Rev Bras Med Vet* 1994; 16(6):256-9.
- Baccaro MR, Moreno AM, Corrêa A, Ferreira AJP, Calderaro FF. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. *Arq Inst Biol* 2002; 69: 15-8.
- Bongers JH, Franssen F, Elbers ARW, Tielen MJM. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from faecal flora of veterinarians with different professional specialties. *Vet Quart* 1995; 17: 146-9.
- Mendes B, Nascimento MJ, Oliveira JS. Preliminary characterization and proposal of microbiological quality standard of sand beaches. *Water Science and Technology* 1993; 27 (3-4) 453-6.
- Speck ML. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, D.C.: American Public Health Association; 1993.
- Silva N, Junqueira VAC, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Livraria Varela; 1997.
- Nijsten R, London N, Bogaard A, Stobberingh VD. Antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* isolated from faecal flora of fattening pigs. *Vet Quart*, 1993; 15: 152-7.

Endereço para correspondência:
Rita Denise Niederauer Weiss
Rua Barão do Triunfo, 1420 apto. 702
CEP. 97105 - 070 RS, Brasil
rdnweiss@yahoo.com.br,
fone (55)3028-3082 / (55) 9985-0897