

## COLIFORMES FECAIS EM ÁGUAS DE ESGOTO. II. TRANSFERÊNCIA DE MARCADORES E PRESENÇA DE PLASMÍDEOS

ANA CAROLINA PAULO VICENTE, JOSÉ CAVALCANTE DE ALBUQUERQUE RIBEIRO  
DIAS & ERNESTO HOFER

Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia, Caixa Postal 926, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**Fecal coliforms in sewage treatment: II. Genetic transfer and plasmids** – *The transference of the genetic markers and the presence of DNA plasmidial in 240 cultures of Escherichia coli was investigated.*

*The strains were originated from Waste Treatment Plant (influent and effluents) located in Ilha do Governador, Rio de Janeiro.*

*By conjugation analysis, E. coli K 12 allowed the isolation of the transconjugants resistant to antibiotics Su, Sm, Tc, Cm, Ap; heavy metals (Cu, Hg and Zn) and colicinogenic factors (Ia, Ib and V) mainly in coliforms isolated Cm and Ap from the terminals of the treatment plant.*

*The percentual distribution of the plasmids was prevalent in the cultures of E. coli originated from material collected in the effluents and reached a rate higher than 65%.*

Key words: sewage treatment – *Escherichia coli* – R, Col, Cu, Hg and Zn plasmids

Os problemas de ordem microbiológica decorrentes do lançamento de águas de esgotos no meio ambiente, em particular em diferentes sistemas aquáticos (rios, lagoas e mares) foram apontados e discutidos em vários períodos por Dienert & Guillerd, 1940; Mishra & Rao, 1967; Brisou, 1968; Hofer & Costa, 1972; Grimes et al., 1984 e Martins et al., 1984.

A situação se torna mais complexa quando da veiculação para o meio ambiente de bactérias albergando fatores genéticos de importância médica (Grabow et al., 1975; Varma et al., 1976; Bell, 1978; Timoney et al., 1978; Bell et al., 1980; Dhillon & Dhillon, 1981; Câmara et al., 1982; Sato et al., 1983; Al-Jebouri, 1985 e Rowbury, 1985).

Tais fatores estão associados a plasmídeos, que podem se transferir intergenericamente nos constituintes da família *Enterobacteriaceae* (Anderson, 1968), inclusive envolvendo a aquisição destes elementos genéticos por representantes patogênicos como *Salmonella* e *Shigella*.

Considerando as possíveis implicações de or-

dem ecológica e sanitária do problema, objetivou-se analisar alguns modelos de marcadores genéticos, incluindo o DNA plasmidial, em coliformes fecais isolados de estação de tratamento de esgotos da cidade do Rio de Janeiro.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Amostragem:** foram analisadas 240 culturas de *Escherichia coli* isoladas de afluente e efluentes da Estação de Tratamento de Esgotos da Ilha do Governador (ETIG), localizada no município do Rio de Janeiro, RJ. Em estudos preliminares investigou-se a resistência a antimicrobianos e metais pesados, acrescida da pesquisa de colicina (Dias et al., 1987).

**Experimentos de conjugação:** as amostras de *E. coli* com marcadores genéticos foram utilizadas como doadoras e, como receptoras as culturas padrão de *E. coli* K 12 C 600 Na<sup>r</sup> (Laboratório de Fisiologia Celular, Instituto de Biofísica, UFRJ) e K 12 Sm<sup>r</sup> (Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Edimburgo, Escócia).

As misturas conjugantes, incubadas em banho-maria, por 24 h a 37°C foram semeadas em placas com Agar Mueller-Hinton (Difco) ou Agar Nutriente (Difco), contendo drogas nas seguintes concentrações: sulfadiazina (Su) e sulfa-

to de cobre (Cu), 200  $\mu\text{g/ml}$ ; sulfato de zinco (Zn), 100  $\mu\text{g/ml}$ ; tetraciclina (Tc), cloranfenicol (Cm) e canamicina (Km), 20  $\mu\text{g/ml}$ ; estreptomicina (Sm), ampicilina (Ap) e gentamicina (Gm), 10  $\mu\text{g/ml}$  e cloreto de mercúrio (Hg), 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Na dependência da cepa receptora utilizada ( $\text{Sm}^{\text{r}}$  ou  $\text{Nal}^{\text{r}}$ ), concentrações de 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, foram também incorporadas ao meio para contra-seleção da amostra doadora.

*Isolamento de DNA plasmidial:* foram utilizados os métodos de Birnboim & Doly (1979) e Kado & Liu (1981), submetendo as suspensões de DNA em gel de agarose (0,7 g%) à eletroforese, corando-se posteriormente, com solução de brometo de etídio (1  $\mu\text{g/ml}$ ) e revelando-se por transiluminação com lâmpadas U. V.

*Análise estatística:* nos resultados referentes à detecção de plasmídeos em amostras de *E. coli* isoladas de afluentes e efluentes aplicou-se o teste não paramétrico de qui-quadrado, considerando a rejeição da hipótese nula, ao nível de  $p < 0,01$ .

## RESULTADOS

A Tabela I ressalta a prevalência de marcadores genéticos nas amostras de *Escherichia coli* isoladas dos efluentes (90,0 e 95,0%).

Com o intuito de se promover um melhor reconhecimento dos perfis genéticos das culturas e, subsequente a transferência de marcadores, os dados da Tabela I foram subdivididos pelas quatro coletas realizadas (Tabelas II a V). Assinala-se neste sentido o encontro de maior heterogeneidade de perfis nas culturas isoladas nas terceira e quarta coletas (Tabelas

III e IV). Por outro lado, a positividade de transferência de marcadores por conjugação, revelou-se mais acentuada nos coliformes isolados nas duas fases iniciais da investigação (Tabelas I e II).

A Tabela VI evidencia a detecção de DNA plasmidial na amostragem, particularmente expressiva nas culturas originárias dos efluentes (66,5 e 75,0%) e com significância estatística ( $p < 0,01$ ).

## DISCUSSÃO

É relevante o percentual de culturas de *E. coli* com marcadores, oriundas do afluente (Tabela I) retratando a possível pressão seletiva a que estão submetidas no hospedeiro humano, pelo reconhecimento de que a descarga fecal que aflui à estação, corresponde em sua maioria, a esgotos domésticos. Outro dado de destaque nesta tabela, diz respeito à prevalência de amostras com determinantes genéticos nos efluentes (decantador e digestor secundários), exibindo taxas superiores àquela identificada a partir do afluente. Achados semelhantes foram descritos por Grabow, Van Zyl & Prozesky (1976) e Bell (1978), em estudos sobre a prevalência de fatores R em coliformes fecais de águas de esgoto.

Analisando os perfis genéticos das culturas e os resultados dos experimentos de conjugação, por setores de colheita, salienta-se a discreta transferência de marcadores nas amostras originárias de afluente, nas quatro coletas realizadas (Tabelas II, III, IV e V), embora se tenha evidenciado o fenômeno na maioria dos determinantes, excetuando-se Cm, Km e Cu. Em contraposição, Câmara et al. (1982) assinalaram a transferência dos marcadores Cm e Km em amostras de *Salmonella* provindas de afluente de outra estação de tratamento desta cidade.

TABELA I

Distribuição numérica e percentual das culturas de *Escherichia coli* portadoras de marcadores genéticos isoladas da Estação de Tratamento da Ilha do Governador

Setor	Culturas isoladas	Culturas com marcadores genéticos	
		Nº	%
Afluente	80	52	65,0
Efluente do decantador secundário	80	76	95,0
Efluente do digestor secundário	80	72	90,0
Total	240	200	83,0

TABELA II

Distribuição dos perfis genéticos e marcadores transferidos por conjugação entre as culturas de *Escherichia coli* isoladas da Estação de Tratamento da Ilha do Governador na primeira coleta

Setor	Amostras examinadas		Perfil genético	Marcadores transferidos
	Positivas	Total		
Afluentes	2	19	sensível-Col <sup>-</sup> (1)*	N.R.**
			Hg (1)	—
			Zn (13)	—
			Cu-Zn (2)	—
			Hg-Zn (2)	Hg (1)
		Su-Sm-Tc-Cm-Ap-Hg (1)	Sm, Ap e Hg (1)	
Efluente do decantador secundário	1	16	sensível-Col <sup>-</sup> (4)	N.R.
			Zn (14)	—
			Tc-Zn (1)	Tc (1)
			Su-Zn-Col V (1)	—
Efluente do digestor secundário	10	20	Cu (3)	—
			Cu-Hg (4)	Hg (2)
			Cu-Zn (2)	—
			Hg-Zn (7)	Hg (4)
			Tc-Hg-Zn (1)	Tc (1)
			Cu-Hg-Zn (2)	Hg (2)
		Su-Sm-Tc-Cm-Ap (1)	Su e Cm (1)	

\* Os números entre parênteses exprimem frequência numérica.

\*\* Não se realizou experimento de conjugação.

TABELA III

Distribuição dos perfis genéticos e marcadores transferidos por conjugação entre as culturas de *Escherichia coli* isoladas da Estação de Tratamento da Ilha do Governador na segunda coleta

Setor	Amostras examinadas		Perfil genético	Marcadores transferidos
	Positivas	Total		
Afluentes	0	20	sensível-Col <sup>-</sup> (20)*	N.R.**
Efluente do decantador secundário	20	20	Col I <sub>a</sub> -I <sub>b</sub> -V (20)	Col I <sub>a</sub> , I <sub>b</sub> e V (20)
Efluente do digestor secundário	6	19	sensível-Col <sup>-</sup> (1)	N.R.
			Cu (9)	—
			Sm-Tc (1)	—
			Sm-Cu (1)	—
			Su-Col I <sub>b</sub> -V (1)	—
			Sm-Tc-Col I <sub>b</sub> -V (1)	Sm e Tc (1)
			Su-Sm-Tc-Ap-Hg (4)	Su, Sm e Ap (4)
Su-Sm-Col I <sub>b</sub> -V-Cu-Zn (1)	—			
		Su-Sm-Tc-Ap-Col I <sub>b</sub> -V-Hg (1)	Su, Sm, Tc, Ap, Col I <sub>b</sub> , V (1)	

\* Os números entre parênteses exprimem frequência numérica.

\*\* Não se realizou experimento de conjugação.

TABELA IV

Distribuição dos perfis genéticos e marcadores transferidos por conjugação entre as culturas de *Escherichia coli* isoladas da Estação de Tratamento da Ilha do Governador na terceira coleta

Setor	Amostras examinadas		Perfil genético	Marcadores transferidos
	Positivas	Total		
Afluente	1	13	sensível-Col <sup>-</sup> (7)*	N.R.**
			Tc (1)	—
			Ap (1)	—
			Zn (5)	Zn (1)
			Su-Sm (2)	—
			Su-Tc (1)	—
			Su-Sm-Tc (1)	—
			Su-Sm-Tc-Cm-Hg (2)	—
Efluente do decantador secundário	1	20	Cu (7)	—
			Hg (4)	—
			Sm-Tc (3)	—
			Tc-Ap (1)	—
			Ap-Hg (1)	Ap (1)
			Cu-Hg (2)	—
			Sm-Tc-Cu (1)	—
			Su-Sm-Tc-Km-Ap (1)	—
Efluente do digestor secundário	6	20	Cm-Km-Ap (1)	—
			Cm-Km-Nal (1)	—
			Cm-Km-Gm (1)	—
			Su-Cm-Km-Gm (1)	—
			Tc-Cm-Km-Ap (1)	Tc (1)
			Cm-Km-Nal-Gm (1)	—
			Sm-Cm-Km-Ap-Gm (1)	—
			Cm-Km-Ap-Gm-Zn (2)	Cm e Ap (1)
			Sm-Tc-Cm-Km-Ap-Gm (1)	—
			Su-Tc-Cm-Km-Ap-Nal-Gm (2)	Su, Tc e Ap (1)
			Su-Cm-Km-Nal-Gm-Cu-Zn (1)	Su e Cu (1)
			Sm-Cm-Km-Ap-Nal-Gm-Zn (1)	—
			Su-Sm-Cm-Km-Ap-Nal-Gm-Zn (2)	—
			Su-Tc-Cm-Km-Ap-Nal-Cu-Zn (1)	Su, Ap e Cu (1)
Sm-Cm-Ap-Nal-Gm-Cu-Hg-Zn (1)	—			
Su-Sm-Tc-Cm-Km-Ap-Nal-Gm-Zn (1)	—			
Su-Tc-Cm-Ap-Nal-Gm-Cu-Hg-Zn (1)	Su, Ap, Cu e Hg (1)			

\* Os números entre parênteses exprimem frequência numérica.

\*\* Não se realizou experimento de conjugação.

No que se refere aos efluentes, tanto as amostras de *E. coli* do digestor secundário, como as do decantador apresentaram comportamento similar nos testes de conjugação. As culturas isoladas do digestor revelaram uma multiplicidade de combinações de perfis genéticos, entretanto a transferência, quando observada incidiu particularmente nos coliformes com maior expressão numérica de marcadores (Tabelas II a V). Por sinal, Grabow et al. (1975) chamaram a atenção para as progressões nas taxas de coliformes R<sup>+</sup> nos setores terminais de sistemas de tratamento de esgotos.

Outro elemento de abordagem situa-se na

identificação de DNA plasmidial nas culturas de *E. coli* (Tabela VI), com diferença significativa entre as taxas obtidas para os coliformes oriundos dos efluentes e aqueles providos do afluente. A expressão deste resultado caracteriza bem a vantagem seletiva dos coliformes portadores de plasmídeos frente ao tratamento biológico de esgotos. Aliás, Sato et al. (1983) detectaram a presença de *E. coli* enterotóxica em águas e esgoto em nosso meio, e Vinhas & Almeida (1984) apontaram a presença de plasmídeo expressando concomitantemente resistência a antibióticos e produção de colicina em *Salmonella typhimurium* isoladas de águas de esgoto.

TABELA V

Distribuição dos perfis genéticos e marcadores transferidos por conjugação entre as culturas de *Escherichia coli* isoladas da Estação de Tratamento da Ilha do Governador na quarta coleta

Setor	Amostras examinadas		Perfil genético	Marcadores transferidos
	Positivas	Total		
Afluente	3	20	Sm (2)*	—
			Tc (1)	—
			Km (2)	—
			Col V (1)	—
			Su-Sm (1)	—
			Su-Tc (2)	Su e Tc (2)
			Sm-Tc (1)	—
			Sm-Km (6)	—
			Cm-Km (1)	—
			Km-Ap (2)	—
			Su-Tc-Km-Col V (1)	Su e Col V (1)
Efluente do decantador secundário	5	20	Tc (1)	—
			Tc-Col V (2)	—
			Sm-Tc-Col V (1)	—
			Su-Sm-Tc-Ap (6)	Ap (1); Tc e Ap (3) e Su, Tc e Ap (1)
			Tc-Cm-Km-Ap-Nal-Gm (1)	—
			Sm-Tc-Cm-Km-Gm-Col V (1)	—
			Sm-Tc-Cm-Km-Ap-Nal-Col V (1)	—
			Su-Sm-Tc-Cm-Km-Ap-Nal-Gm (3)	—
			Sm-Tc-Cm-Km-Ap-Nal-Gm-Col V (4)	—
			sensíveis-Col <sup>m</sup> (7)	N.R.**
Efluente do digestor secundário	1	13	Tc (1)	—
			Col E <sub>2</sub> (1)	—
			Zn (1)	—
			Sm-Tc (1)	—
			Tc-Zn (1)	—
			Su-Sm-Zn (1)	—
			Cu-Col E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> (1)	—
			Cu-Zn-Col E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> -V (3)	—
			Cu-Col E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> -I <sub>b</sub> -V (1)	—
			Su-Sm-Tc-Cm-Ap-Zn (2)	Su, Sm, Tc, Cm e Ap (1)

\* Os números entre parênteses exprimem frequência numérica.

\*\* Não se realizou experimento de conjugação.

TABELA VI

Distribuição numérica e percentual das culturas de *Escherichia coli* portadoras de plasmídeos, isoladas nas quatro colheitas realizadas na Estação de Tratamento da Ilha do Governador

Setor	Número de culturas isoladas	Culturas com DNA plasmidial	
		Nº	%
Afluente	80	20	25,0
Efluente do decantador secundário	80	60	75,0
Efluente do digestor secundário	80	53	66,5
Total	240	133	55,4

$$\chi^2 = 46,10 (p < 0,01)$$

Um outro aspecto merecedor de estudos mais aprofundados no futuro, relaciona-se aos resultados da Tabela VI com os discriminados nas Tabelas II a V. Neste caso questiona-se a não transferência de marcadores em muitas das culturas isoladas dos efluentes e afluentes. As possíveis explicações podem estar relacionadas à localização cromossômica desses marcadores; a alterações genéticas nos plasmídeos, onde estariam situados os genes para a expressão das características estudadas; à incapacidade de recepção destes plasmídeos pela cepa padrão utilizada e talvez da necessidade de se adequar a temperatura para os experimentos de conjugação àquela do sistema de onde as amostras foram isoladas (Broda, 1979).

Por outro lado, ainda que se considerem os fatores limitantes da sobrevivência de coliformes, em águas de mar, como a salinidade (Orlob, 1956 e Carlucci & Pramer, 1960 a, b, c), o lançamento constante de bactérias com marcadores genéticos nesse ambiente, sem dúvida, representará uma fonte constante e importante na propagação de plasmídeos bacterianos (Linton et al., 1974; Bell et al., 1980; Al-Mossawi et al., 1982 e Grimes et al., 1984). Aliás, são pertinentes as suposições de Timoney et al. (1978) que a contaminação de um ecossistema por metais pesados, por exemplo, resultará na pressão seletiva sobre bactérias que albergam além de plasmídeos de resistência a estes íons, resistência a antibióticos, como constataram ao analisar a flora bacteriana de sedimentos da baía de Nova Iorque.

A magnitude do problema detectado se traduz nas possíveis interferências na saúde da população, em particular quando se reconhece a mobilização de diferentes plasmídeos para bactérias patogênicas, como representantes dos gêneros *Salmonella* e *Vibrio*, além da disseminação de bactérias com estas características em organismos superiores, como atestam Lopes & Moreno (1972) e Patrick & Loutit (1976).

É aconselhável que outros procedimentos complementares aos métodos convencionais de tratamento de esgotos sejam projetados e analisados, visando principalmente minimizar ou interromper o lançamento de bactérias portadoras de plasmídeos ao meio ambiente, através de efluentes.

#### RESUMO

**Coliformes fecais em águas de esgoto. II. Transferência de marcadores e presença de**

**plasmídeos** — Investigou-se a transferência de marcadores genéticos e a presença de DNA plasmidial em 240 culturas de *Escherichia coli* originárias de água de esgoto (afluente e efluentes) da Estação de Tratamento da Ilha do Governador, na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

Experimentos de conjugação com *E. coli* K 12 permitiram o isolamento de transconjugantes com resistência a antibióticos (Su, Sm, Tc, Cm e Ap); a metais pesados (Cu, Hg e Zn) e fatores colicinogênicos (Col Ia, Ib e V) principalmente para os coliformes isolados nos setores terminais da estação de tratamento.

A distribuição de plasmídeos foi prevalente nas culturas de *E. coli* advindas dos efluentes, com percentuais superiores a 65.

Palavras-chave: águas de esgoto — *Escherichia coli* — plasmídeos R, Col, Cu, Hg e Zn

#### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Pedro Carvalho Rodrigues, do Departamento de Saúde da Comunidade, da Universidade Federal Fluminense, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Aos Srs. Técnicos Evaldo Soares da Silva, Deise Paranhos, Maria Severina Pinheiro e Emilson Domingos da Silva, pela contribuição no preparo de material e meios de cultura.

#### REFERÊNCIAS

- AL-JEBOURI, M. M., 1985. A note on antibiotic resistance in the bacterial flora of raw sewage and sewage-polluted River Tigris in Mosul, Iraq. *J. Appl. Bacteriol.*, 58: 401-405.
- AL-MOSSAWI, A. J.; KADRI, M.; SALEM, A. & SALAMA, M., 1982. Incidence of Antibiotic Resistant Fecal Coliforms in the Coastal Waters of Kuwait. *Water, Air and Soil Poll.*, 17: 141-148.
- ANDERSON, E. S., 1968. The ecology of transferable drug resistance in the *Enterobacteriaceae*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2: 131-180.
- BELL, R. B., 1978. Antibiotic resistance patterns of fecal coliforms isolated from domestic sewage before and after treatment in an aerobic lagoon. *Can. J. Microbiol.*, 24: 886-888.
- BELL, J. B.; MACRAE, W. R. & ELLIOTT, G. E., 1980. Incidence of R Factors in Coliform, Fecal Coliform, and *Salmonella* Populations of the Red River in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 486-491.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acids Res.*, 7: 1513-1523.
- BRISOU, J., 1968. La pollution microbienne, virale et parasitaire des eaux littorales et ses conséquences

- pour la santé publique. *Bull. Org. Mond. Santé*, 38: 79-118.
- BRODA, P., 1979. *Plasmids*. W. H. Freeman & Co. Ltd. San Francisco, USA.
- CÂMARA, F. P.; COSTA, G. A.; HOFER, E. & ALMEIDA, D. F., 1982. Drug Resistance in *Salmonella* strains isolated from raw sewage in Rio de Janeiro. *Rev. Brasil. Biol.*, 42: 421-424.
- CARLUCCI, A. F. & PRAMER, D., 1960a. An Evaluation of Factors Affecting the Survival of *Escherichia coli* in Sea Water. I. Experimental Procedures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 8: 243-246.
- CARLUCCI, A. F. & PRAMER, D., 1960b. An Evaluation of Factors Affecting the Survival of *Escherichia coli* in Sea Water. II. Salinity, pH and Nutrients. *Appl. Environ. Microbiol.*, 8: 247-250.
- CARLUCCI, A. F. & PRAMER, D., 1960c. An Evaluation of Factors Affecting the Survival of *Escherichia coli* in Sea Water. III. Antibiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 8: 251-254.
- DHILLON, T. S. & DHILLON, E. K. S., 1981. Incidence of Lysogeny, Colicinogeny, and Drug Resistance in Enterobacteria Isolated from Sewage and from Rectum of Humans and Some Domesticated Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 894-902.
- DIAS, J. C. A. R.; VICENTE, A. C. P. & HOFER, E., 1987. Coliformes fecais em águas de esgoto: I. Resistência a antibióticos, metais pesados e colicinogenia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 335-343.
- DIENERT, F. & GUILLERD, A., 1940. Étude de la Pollution de l'Eau de Mer par le Déversement des Eaux d'égouts. *Ann. Hyg. Publ. Ind. Soc.*, XVIII: 210-217.
- GRABOW, W. O. K.; PROZESKY, O. W. & SMITH, L. S., 1975. Drug resistant coliforms: call for re-evaluation of water quality standards. *Water Pollut. Control*, 74: 217-224.
- GRABOW, W. O. K.; VAN ZYL, M. & PROZESKY, O. W., 1976. Behavior in Conventional Sewage Purification Processes of Coliform Bacteria with Transferable or Non-Transferable Drug-Resistance. *Water Res.*, 10: 717-723.
- GRIMES, D. J.; SINGLETON, F. L.; STEMMLER, J.; PALMER, L. M.; BRAYTON, P. & COLWELL, R. R., 1984. Microbiological Effects of Wastewater Effluent Discharge into Coastal Waters of Puerto Rico. *Water Res.*, 100: 1-7.
- HOFER, E. & COSTA, G. A., 1972. Investigaç o sobre a ocorr ncia de *Salmonella* em esgotos sanit rios da cidade do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 70: 221-236.
- KADO, C. I. & LIU, S. T., 1981. Rapid procedures for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145: 1365-1373.
- LINTON, K. B.; RICHMOND, M. H.; BEVAN, R. & GILLESPIE, W. A., 1974. Antibiotic Resistance and R Factors in Coliform Bacilli Isolated from Hospital and Domestic Sewage. *J. Med. Microbiol.*, 7: 91-103.
- LOPES, C. A. M. & MORENO, S., 1972. Estudo "in vitro" sobre a resist ncia a drogas de microrganismos isolados de pescado de origem marinha. *Arq. Inst. Biol.*, S o Paulo, 39: 317-325.
- MARTINS, M. T.; ALVES, M. N.; SANCHEZ, P. S. & SATO, M. I. Z., 1984. Evaluation of the Fecal Coliforms/Fecal Streptococci Ratio in the Characterization of Fecal Pollution in a Subtropical River. *Rev. Microbiol.*, S o Paulo, 15: 94-102.
- MISHRA, R. P. & RAO, N. U., 1967. The Incidence of Coliforms and Faecal Streptococci in Sewage and Polluted Waters. *Environ. Health*, 9: 9-12.
- ORLOB, G. T., 1956. Steam Pollution. Viability of Sewage Bacteria in Sea Water. *Sewage Ind. Wastes*, 28: 1147-1167.
- PATRICK, F. M. & LOUTIT, M., 1976. Passage of metals in effluents, through bacteria to higher organisms. *Water Res.*, 10: 333-335.
- ROWBURY, R. J., 1985. The Effects of the Virulence Plasmid Col V I-K 94 on the Survival of *Escherichia coli* in Sewage Effluent. *Zbl. Mikrobiol.*, 140: 309-315.
- SATO, M. I.; SANCHEZ, P. S.; MARTINS, M. T.; REIS, M. H. L. & TRABULSI, L. R., 1983. Isolation of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in water and sewage in S o Paulo, Brazil. *Rev. Microbiol.*, S o Paulo, 14: 276-281.
- TIMONEY, J. F.; PORT, J.; GILES, J. & SPANIER, J., 1978. Heavy-Metal and Antibiotic Resistance in the Bacterial Flora of Sediments of New York Bight. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 465-472.
- VARMA, M. M.; THOMAS, W. A. & PRASAD, C., 1976. Resistance to Inorganic Salts and Antibiotics Among Sewage-borne *Enterobacteriaceae* and *Achromobacteriaceae*. *J. Appl. Bacteriol.*, 41: 347-349.
- VINHAS, S. A. & ALMEIDA, D. F., 1984. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Colicinogeny Among *Salmonellae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Ann. Acad. Brasil. Ci nc.*, 56: 319-322.