



Rede UFF de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável
Núcleo de Extensão e Pesquisa



Determinação do $T_{90\%}$ de *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC) selvagens em presença de contaminantes no ambiente costeiro

Coordenação: Julio Cesar Wasserman

Niterói, 25 de julho de 2011

Determinação do $T_{90\%}$ de *Escherichia coli* diarrreio gênicas (DEC) selvagens em presença de contaminantes no ambiente costeiro

RESUMO

A colimetria vem sendo largamente utilizada pelas agências ambientais e pelas prefeituras em áreas costeiras e rios como indicador da balneabilidade. Contudo, sua aplicação problemática, pois após a coleta o resultado só é disponibilizado após 24 horas e só vai ser afixado 2 a 3 dias após a coleta. Neste prazo, a qualidade da água pode mudar e a credibilidade da indicação fica comprometida. Um maneira alternativa de se determinar a balneabilidade é através dos modelos hidrodinâmicos de transporte, onde pode ser colimetria é inserida como um poluente semi-conservativo, desde que atribuída uma taxa de degradação (mortalidade) chamada $T_{90\%}$. Esta metodologia pode permitir a estimativa da colimetria em tempo real, desde que os parâmetros vento e aporte de água doce sejam bem avaliados e, principalmente que o $T_{90\%}$ seja confiável. Observa-se que a genética destas bactérias tem evoluído de maneira significativa o que tem gerado modificações muito significativas no $T_{90\%}$, dificultando a aplicação de um único valor padrão. No presente estudo pretende-se avaliar os $T_{90\%}$ de bactérias presentes em vários sistemas aquáticos do Estado do Rio de Janeiro, incluindo sistemas de água hipersalina até sistemas de água doce (utilizado para abastecimento humano) a fim de determinar os parâmetros genéticos que determinam maior ou menor resistência do microorganismos no ambiente aquático. A metodologia envolve a execução de experimentos *in vitro* de degradação bacteriana com amostras coletadas nas Baías de Ilha Grande, Sepetiba e Guanabara e nas Lagoas de Araruama e Juturnaíba (Rio de Janeiro). Além destes experimentos, as bactérias serão submetidas a análise de PCR para avaliar seu conteúdo genético e sua relação com o $T_{90\%}$.

PALAVRAS CHAVE: Decaimento bacteriano, $T_{90\%}$, FIB, *E. coli*, PCB, HPA, metais pesados, salinidade, nutrientes.

ÁREAS DE CONHECIMENTO: Ciências Ambientais

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar o decaimento em ambientes costeiros das cepas selvagens de *Escherichia coli* diarrreio gênicas (DEC), considerando diferentes salinidades e concentrações de metais pesados (mercúrio, zinco e cádmio), PCBs (mistura de congêneres) e HPAs (gasolina e óleo diesel), NH_4^+ , P-Inorgânico, nas águas das Baías de Guanabara (altamente contaminada), Sepetiba, Ilha Grande (baixa contaminação) e das Lagoas de Araruama (hipersalina) e Juturnaíba (água doce – captação de água para consumo humano).

Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar bioquimicamente as cepas de *E. coli* presentes em esgotos contaminantes das Baía de Guanabara, Sepetiba, Ilha Grande e das Lagoas de Araruama e Juturnaíba, no Estado do Rio de Janeiro.
- Diferenciar as cepas de *E. coli* diarreio gênicas (DEC) utilizando-se da análise de PCR para a detecção dos genes de virulência de cada cepa encontrada nas amostras de esgotos das Baía de Guanabara, Sepetiba, Ilha Grande e das Lagoas de Araruama e Juturnaíba, no Estado do Rio de Janeiro.
- Determinar os tempos de decaimento das cepas de *E. coli* diarreio gênicas (DEC) selvagens dos esgotos das Baías de Guanabara, Sepetiba, Ilha Grande e das Lagoas de Araruama e Juturnaíba, através de experimentos *in vitro* com amostras dos locais.
- Determinar os tempos de decaimento das cepas de *E. coli* selvagens dos esgotos das Baías de Guanabara, Sepetiba, Ilha Grande, das Lagoas de Araruama e Juturnaíba em presença de concentrações de metais pesados, PCBs, HPAs (gasolina, diesel) e de NH_4^- e P-Inorgânico.

RELEVÂNCIA DA PROPOSTA

Os testes colimétricos para monitoramento da balneabilidade das águas costeiras demoram muitas horas e quando concluídos, acabam defasados em relação à qualidade da água no momento da disponibilização do resultado, não correspondendo, assim, aos níveis reais de contaminação fecal. Este é um problema antigo que tem levado as agências ambientais a desfrutarem de pouco crédito na colocação das placas de recomendação de banho. É proposta neste projeto a melhoria da precisão dos valores de tempo de degradação de coliformes em águas costeiras, parâmetro conhecido como T_{90%} (tempo necessário para a mortalidade de 90% das bactérias coliformes em uma amostra de água) de modo que a balneabilidade possa ser estabelecida de maneira mais precisa a partir de modelos hidrodinâmicos. A grande vantagem é que os modelos hidrodinâmicos, quando bem calibrados pelo T_{90%} das bactérias podem fornecer os níveis de contaminação fecal em tempo real. Estes dados também poderão contribuir para a revisão dos critérios de potabilidade e balneabilidade, considerando o desempenho da *E. coli* em relação à metabolização e utilização dos poluentes orgânicos, inorgânicos e metais pesados quando presentes na água e na epidemiologia das doenças de veiculação hídrica.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

As condições de saneamento básico existentes nas cidades litorâneas brasileiras influenciam a qualidade de suas águas costeiras, sendo o aporte de esgotos domésticos para as praias, uma constante (CETESB, 2009). A carga bacteriana originária da contaminação dessas águas, é um fator de risco conseqüente da disseminação das bactérias (LOTHIGIUS et al., 2010) que comprometendo a balneabilidade, ameaçam a saúde dos banhistas e frequentadores. Através da veiculação hídrica e da

rota orofecal ocorrem doenças e sérias epidemias, destacando-se dentre elas as diarreias agudas, causadas pelo grupo dos coliformes.

As *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC), representantes do grupo dos coliformes fecais, podem causar patologias diversas não somente diarreicas, mas também infecções urinárias, meningites e septicemias (NATARO & KAPER, 1998). Essas bactérias diarreio gênicas não podem ser identificadas apenas pelas características bioquímicas, o que as torna indistinguíveis das *E. coli* não patogênicas. A caracterização de tais cepas requer a utilização de técnicas imunológicas, cultivo celular ou técnicas moleculares (WATTERWORTH et al.; 2005).

As DEC são classificadas em seis categorias respectivamente, Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroaderente (EAEC), a *E. coli* que produz toxina Shiga (STEC) e, a *E. coli* que adere difusamente (DAEC), (NATARO et KAPER, 1998). A presença de coliformes em sistemas aquáticos indica poluição fecal e, a possibilidade de outros organismos patogênicos, isto porque, apresentam uma maior capacidade de resistência na água do que outras bactérias patogênicas, que fazem parte da biota intestinal (SANTÉ CANADA, 2006).

A utilização das bactérias do grupo dos coliformes no monitoramento dos corpos d'água assegura padrões sanitários para as fontes, não somente no que se refere a potabilidade, mas também para as atividades recreacionais (CHIGBU, P. et al.; 2005). São, portanto os microrganismos eleitos para a monitoração das águas balneares, seguindo as orientações de diversas instituições, dentre elas a World Health Organization (2010).

Os níveis de microrganismos na água contaminada podem ser utilizados para a avaliação dos riscos à saúde, por isso o nível de decaimento é utilizado nos modelos hidrodinâmicos. O decaimento ou $T_{90\%}$ é considerado o tempo necessário para que 90% da comunidade bacteriana desapareça na água. Este também é um parâmetro que pode ser utilizado para a gestão da qualidade das águas.

Segundo Gourmelon et al. (1997), a água do mar com sua alta osmolaridade e, a limitação de nutrientes, tornam este ambiente hostil para os microrganismos, caso da *E. coli*. Fatores bióticos e abióticos, são condicionantes à sobrevivência e ao decaimento desses indicadores fecais, dentre eles a temperatura, pH, salinidade, radiação UV, predação (THOMANN et MULLER, 1987), nutrientes e poluentes orgânicos e inorgânicos presentes na água. Vários são os estudos sobre a influência de alguns destes fatores no decaimento das bactérias indicadoras fecais. No entanto, no que se refere à pesquisa sobre o decaimento das *E. coli* diarreio gênicas em ambientes aquáticos salinos ou de água doce contaminados com HPAs, PCBs, metais pesados e em presença dos nutrientes NH_4 e PI, nada foi encontrado na literatura até o presente momento.

Estudo *in vitro*, realizado por Greer and Keil (1974), demonstrou que essa bactéria quando no organismo humano, participa da degradação do DDT e dos PCBs. Outro estudo, também *in vitro*, descreve o isolamento de gens responsáveis pela metabolização do PCB pela *E. coli* LB400 (MONDELLO, 1989). Alguns trabalhos reconhecem a *E. coli* por sua capacidade de metabolizar

compostos carbônicos, mas nenhum trabalho foi encontrado sobre a influência deles no decaimento desse patógeno na água, o mesmo ocorrendo com relação aos metais pesados e HPAs.

Área de Estudo.

O trabalho será desenvolvido nas Baías de Guanabara, Sepetiba, Ilha Grande e nas Lagoas de Araruama e Juturnaíba. Estes ecossistemas aquáticos possuem perfis diferenciados para salinidade e níveis de contaminação biológica e química, destacando-se a lagoa de Juturnaíba, por ser um ecossistema de água doce.

A Baía de Guanabara apresenta salinidade pouco abaixo da marinha e apresenta suas águas severamente contaminadas por metais pesados, esgotos domésticos, nutrientes e outros tipo de contaminantes oriundos das diversificadas fontes presentes em sua bacia de drenagem. A Baía de Sepetiba é conhecida por sua alta contaminação em cádmio e zinco, principalmente a nível do sedimento, mas que devido ao contínuo processo de ressuspensão, contamina também a coluna d'água. Nesta baía, também outros poluentes como os nutrientes vêm suas concentrações aumentando de maneira constante em função do crescimento populacional da região. Em termos de salinidade, a Baía de Sepetiba apresenta valores próximos aos da Baía de Guanabara.

A Baía da Ilha Grande, com áreas relativamente afastadas de fontes de contaminação significativas constituem um ambiente de referência.

Como dito anteriormente, a Lagoa de Juturnaíba é um ambiente de água doce, o que oferece ao estudo uma maior abrangência. Além disto, neste corpo é feita a captação de água para consumo humano na Região dos Lagos Fluminense.

Metodologia

Locais de coleta de amostras

As Figuras 1, 2 e 3 indicam os ambiente de onde serão coletadas as amostras. Os esgotos serão coletados a montante de estações de tratamento (normalmente são estações de tempo seco e as amostras podem ser coletadas em cursos d'água). As amostras de água serão coletadas nos corpos d'água e serão deixadas envelhecer durante aproximadamente 60 dias.

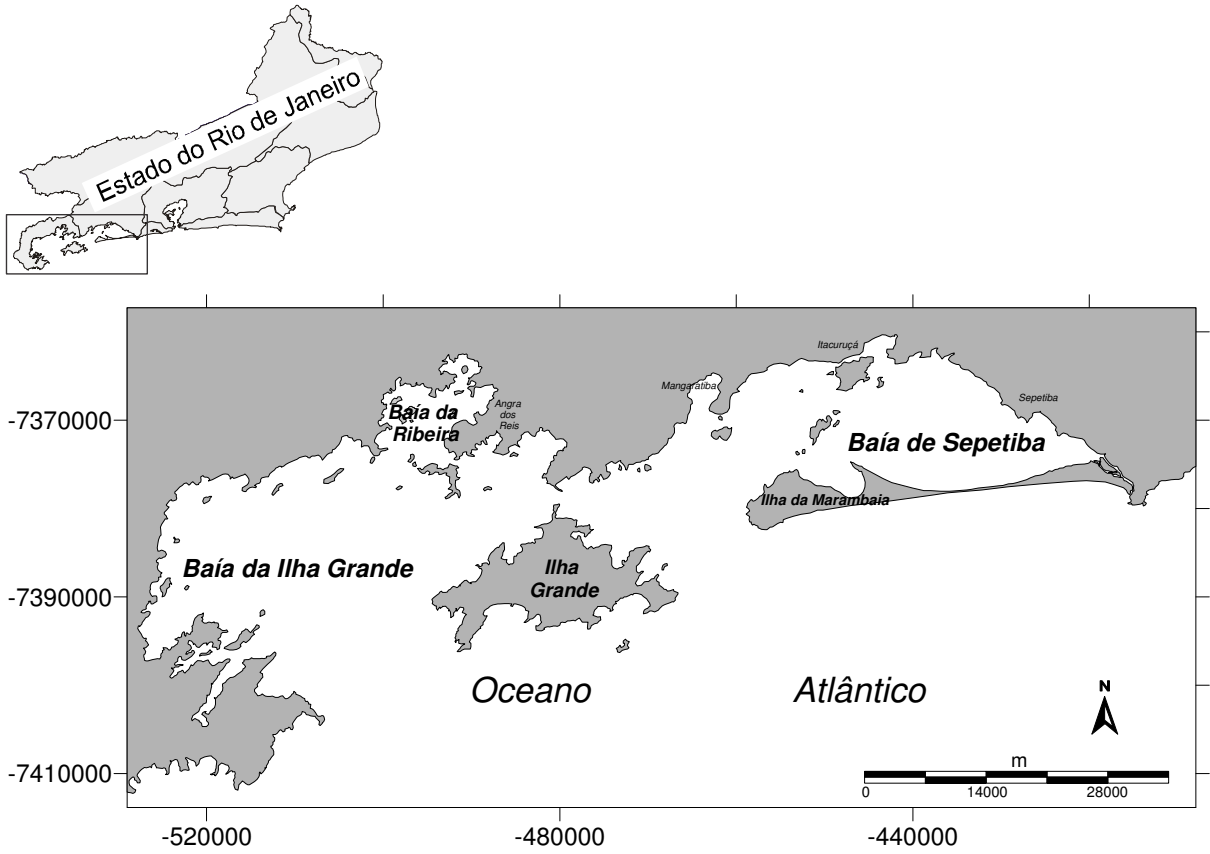


Figura 1: Locais de amostragem: Baías da Ilha Grande e Sepetiba, incluindo a Baía da Ribeira.

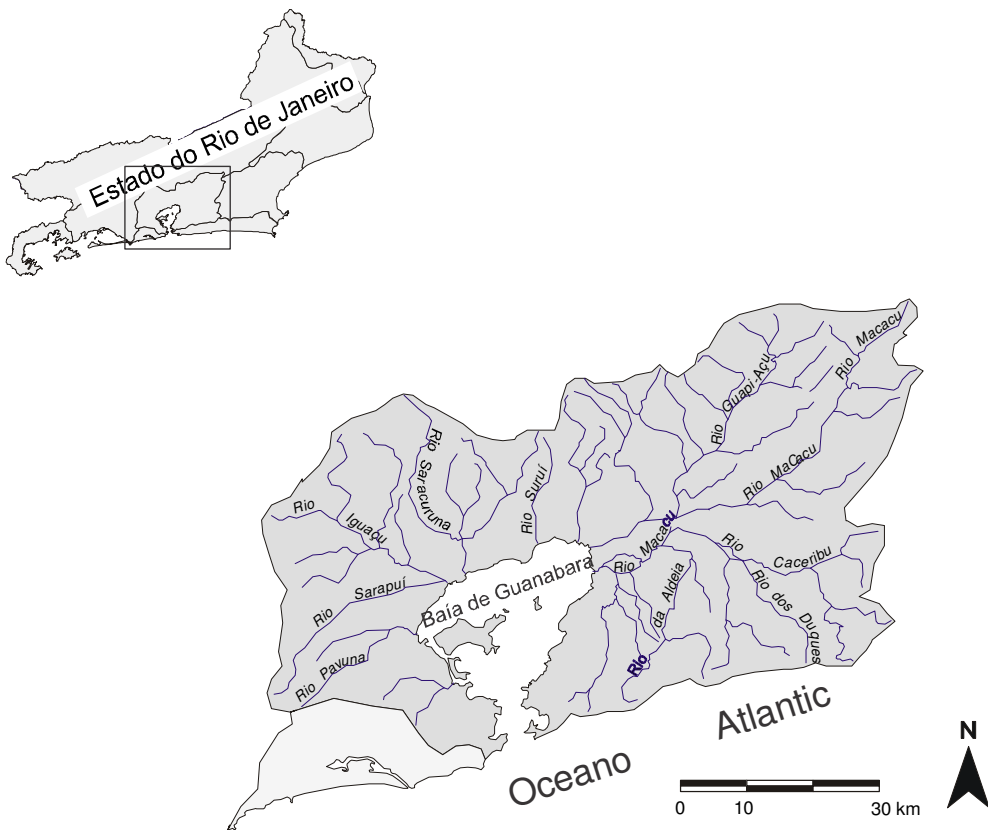


Figura 2: Baía de Guanabara



Figura 3: Região dos Lagos e do CONLEST, apresentando a localização da Lagoa de Araruama e de Juturnaíba

Coletas de água de esgoto

As amostras de água de esgoto serão coletadas em frascos estéreis de 250 mL e sua colimetria será medida no mesmo dia da coleta. Os experimentos serão todos preparados com antecedência, de forma que imediatamente após a coleta, estes serão iniciados.

Bactérias utilizadas para controles

Serão mantidas em TSB/glicerol 20% e mantidas a -20°C , tendo suas procedências e genótipos devidamente identificados.

Condições de Cultivo

Amostras brutas dos esgotos e amostras diluídas a 102^1 em água peptonada a 1% serão inoculadas em ágar MacConkey e incubadas de 18 horas a 24 horas, à $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

*Triagem das culturas para pesquisa de DEC (*E. coli* diarrreio gênicas)*

O material a partir de uma alçada com colônias de cada cultivo irá para tubos de Eppendorf de 1,5 mL com $500\mu\text{g}$ de água destilada estéril para extração de DNA.

Extração de DNA

A extração do DNA será por fervura das suspensões de bactérias por 10 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto. Os sobrenadantes irão para novos tubos e mantidos a -20C.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

A detecção dos genes de virulência associados com os patógenos de *E. coli* diarréio-gênicas será realizado utilizando PCR-Multiplex.

Detecção dos produtos de PCR

A detecção dos produtos de amplificação será por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, como tampão o Tris-Borato EDTA, pH 8,0, 1X concentrado. A separação eletroforética será a 40V por 3 horas. Os géis serão corados por 15 minutos em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL (STAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989), visualizados em transiluminador ultravioleta e imagem registrada em câmera digital.

Identificação da E.coli através de provas bioquímicas.

As colônias positivas para DEC serão caracterizadas bioquimicamente pelo sistema de identificação de API 20E (bioMérieux). O sistema API 20E é uma tira com 20 combos com substratos liofilizados com uma suspensão bacteriana com turvação de 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente 1×10^8 bactérias). Após incubação (4 horas) a leitura será com o padrão das cores que reflete a utilização ou não pela bactéria dos substratos em cada combo.

Determinação do $T_{90\%}$ das Escherichia coli

Para a determinação do $T_{90\%}$ das *Escherichia coli* de cada região serão coletados 3 galões de água de 20L das Baías de Guanabara, Sepetiba, Ilha Grande e Lagoas de Araruama e Juturnaíba. As amostras sofrerão processos de filtração e autoclavação e serão deixadas para envelhecer no escuro por 60 dias.

A análise do decaimento será realizada por incubação seguida de análise da colimetria pelo método enzimático utilizando o Quanti-Tray® Idexx. Cada amostra com 90 mL da água de cada região com 1 floconete de Quanti Tray® e mais 10 mL do efluente será incubada a 37°C nos seguintes tempos: T0'; T20'; T40'; T1h; T2h; T4h; T6h; T8h; T24 h;T48 h;T72 h;T96 h; T144 h; T192 h; T240; T288 h; T336 h; T384 h;T432 h;T480 h; T528h; T576 h; T624 h; T672 h; T720h.

SUPORTE FINANCEIRO:

Projeto Águas de Juturnaíba (Petrobras Ambiental, sub-contratado pela Associação Mico Leão Dourado), que recentemente foi encerrado. Este projeto permitiu a geração de uma importante infra-

EQUIPE

Abílio Soares Gomes

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1D

Licenciado em Ciências Biológicas e Bacharel em Biologia Marinha. Mestre em Zoologia e Doutor em Oceanografia Biológica. Atualmente é Professor Associado III da Universidade Federal Fluminense, atuando em pesquisas em Ecologia de Sedimentos Marinhos e ensino de Ecologia Marinha.

Endereço para acessar o CV completo : <http://lattes.cnpq.br/5096363132370000>

Julio Cesar de Faria Alvim Wasserman

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1D

Oceanógrafo pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (1985), concluiu o doutorado em Oceanologia pela Université de Bordeaux I em 1990 e um Pós-doutorado em química ambiental na Université de Pau et des Pays de l'Adour em 1999. Atualmente é Professor Associado da Universidade Federal Fluminense e Coordenador da Rede UFF de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Atua ainda como Coordenador do Núcleo Rede UFF de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, onde tem trabalhado com pesquisa aplicada a problemas ambientais. No escopo da REMADS-UFF tem coordenado equipes para realizar estudos de impacto ambiental, monitoramentos ambientais, e tem atuado junto a empresas e sociedade civil, buscando novas tecnologias para a solução de impactos ambientais e sustentabilidade. Publicou 55 artigos em periódicos especializados e 132 trabalhos em anais de eventos. Possui 15 capítulos de livros e 4 livros editados. Possui 1 produto tecnológico registrado. Orientou 15 dissertações de mestrado e 5 teses de doutorado, além de ter orientado 21 trabalhos de iniciação científica nas áreas de Oceanografia, Geociências e Ecologia. Atua na área de Oceanografia, Gestão Ambiental, Gerenciamento Costeiro. Tem larga experiência na dinâmica de metais pesados, mas também vem estudando outros tipos de poluentes aquáticos, atmosféricos e de solos. Desde o final dos anos 1999, vem trabalhando com gestão ambiental em uma perspectiva interdisciplinar, interagindo com pesquisadores de diversas áreas, incluindo médicos, engenheiros, geógrafos e sociólogos.

Endereço para acessar o CV completo: <http://lattes.cnpq.br/4365891367994000>

Mirian Araujo Carlos Crapez

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (1976). O doutorado em Metabolismo de aromáticos e poliaromáticos foi realizado na Université D'Aix-Marseille II (1982) e pós-doutorado na Université Paris VI (Pierre et Marie Curie). Atualmente é professor associado da Universidade Federal Fluminense. Realiza trabalhos nas áreas de geomicrobiologia, qualidade de água e de sedimento e biotecnologia marinha, que incluem estudos de bioindicadores e biomarcadores, biorremediação, produção de surfactantes bacterianos e alça microbiana. As pesquisas são realizadas tanto na coluna d'água como no sedimento de ambientes estuarinos e costeiros. São estudados e quantificados biopolímeros (proteínas, carboidratos e lipídios) e matéria orgânica, quantificação do carbono de bactérias autótrofas e heterótrofas, produção bacteriana, bactérias termotolerantes e viáveis, atividades enzimáticas de esterases e do sistema transportador de elétrons, bactérias hidrocarbonoclasticas e produtoras de biosurfactantes e aplicação da biorremediação in situ e ex situ.

Endereço para acessar o CV completo: <http://lattes.cnpq.br/3294503747791852>

Myriam Bandeira Vianna Cortes

Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha da UFF

Pesquisador Associado na Rede UFF de Meio ambiente e Desenvolvimento Sustentável, REMADS - UFF, atua em projetos envolvendo temas na área de Gestão Estratégica de Informações Ambientais Aplicadas à Microbiologia e à Recursos Hídricos. Possui graduação em Direito pela Universidade Estácio de Sá (1997) e com atuação como Delegada Ambiental da OAB (2002), com graduação em Farmácia pela Universidade Federal Fluminense (1981) e Licenciatura e Bacharelado em Ciências Físicas e Biológicas pela Fundação Técnico Educacional Souza Marques (1977). É professora adjunta IV da Universidade Federal Fluminense no Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico, desde 1980, lecionando para os cursos de Biologia, Biomedicina, Farmácia, Veterinária, Enfermagem, Odontologia, Nutrição e Engenharia Agrária, Engenharia de Recursos Hídricos, Iniciação à Docência I, II, III, IV, Iniciação à Pesquisa I.

Endereço para acessar o CV completo: <http://lattes.cnpq.br/8094082596932632>

Paulo Rubens Guimarães Barrocas

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia e Meio Ambiente (FIOCRUZ)

Possui graduação em Oceanografia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (1990), mestrado em Geociências (Geoquímica) pela Universidade Federal Fluminense (1994) e doutorado em Oceanografia - Florida State University (2003). Atualmente é Pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz, onde desenvolve pesquisas e leciona nos cursos de Pós-graduação da Escola Nacional de Saúde Pública. Atua nas áreas: Química Ambiental, com ênfase na Análise de Traços; Geoquímica Ambiental, com ênfase na Poluição de Ecossistemas Aquáticos por Metais Pesados; Saúde Pública, com ênfase na Vigilância em Saúde Ambiental. Os principais temas estudados são: mercúrio, bactéria, sedimentos e resistência.

Endereço para acessar o CV completo: <http://lattes.cnpq.br/7417258240533689>

Pode incluir outros: Otilio...

ORÇAMENTO

Item	Valor unitário	Quantidade	Total
Diárias			
Diárias de campo	R\$ 80.00	30	R\$ 2,400.00
Diárias de participação em congresso nacional	R\$ 194.58	16	R\$ 3,113.28
Diárias de participação em congresso internacional	R\$ 250.00	8	R\$ 2,000.00
Total de diárias			R\$ 7,513.28
Passagens			
Passagens nacionais	R\$ 890.00	4	R\$ 3,560.00
Passagens internacionais	R\$ 3,500.00	2	R\$ 7,000.00
Total de passagens			R\$ 10,560.00
Material de consumo			
Reagentes	R\$ 8,900.00	1	R\$ 8,900.00
vidraria de laboratório	R\$ 6,000.00	1	R\$ 6,000.00
Consumíveis para colimetria (colilert)	R\$ 1,000.00	8	R\$ 8,000.00
Consumíveis para PCR	R\$ 5,000.00	1	R\$ 5,000.00
Gases especiais	R\$ 2,000.00	2	R\$ 4,000.00
Combustível para trabalho de campo	R\$ 2.30	400	R\$ 920.00
Material de consumo de escritório em geral	R\$ 3,000.00	1	R\$ 3,000.00
Cartuchos de impressora a laser e consumíveis de informática	R\$ 200.00	12	R\$ 2,400.00
Total de material de consumo			R\$ 38,220.00
Serviços Pessoa Jurídica			
Reparação de equipamentos	R\$ 600.00	12	R\$ 7,200.00
Instalação de equipamentos	R\$ 800.00	8	R\$ 6,400.00
Total de Pessoa Jurídica			R\$ 13,600.00
Equipamentos			
Computador desk-top	R\$ 2,000.00	1	R\$ 2,000.00
impressora desk-jet	R\$ 400.00	1	R\$ 400.00
Termo-ciclador PCR com detector	R\$ 18,800.00	4	R\$ 75,200.00
multi-pipetas automáticas para PCR	R\$ 500.00	5	R\$ 2,500.00
Total de equipamentos			R\$ 80,100.00
Total Geral			R\$ 149,993.28

REFERÊNCIAS

1. CHIGBU, P.; GORDON, S.; STRANGE, T. R. Fecal coliform bacteria disappearance rate in a North-central Gulf of Mexico Estuary. **Estuarine, Coastal and shelf Science**, v.65, 309-318, 2005.
2. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de Qualidade das praias litorâneas no estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2009. 168 p.
3. GOURMELON, M.; TOUATI, D.; POMMEPUY, M. & CORMIER, M. Survival of *Escherichia coli* exposed to visible light in seawater: analysis of rpoS-dependent effects. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p.1036-1043, 1997.
4. GREER, D.E. AND KEIL, J.E. The Effect of DDT and PCB on Lipid metabolism in *E. coli* and *B. fragilis*. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, v.12. n.3, 1974.
5. LOTHIGIUS, Å; SJÖLING, Å; SVENNERHOLM, A. M. and BÖLIN, I. Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater. **Journal of Applied Microbiology**, 108, 1441-1449, 2010.
6. MONDELLO, F. J. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* Strain LB400 Genes Encoding Polychlorinated Biphenyl Degradation. *Journal of Bacteriology*, p. 1725-1732, 1989.
7. NATARO, J.P. et KARPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, n. 1, Jan, p. 142-201, 1998.
8. SANTÉ CANADA. **Recommandations pour la qualité de l'eau potable au CANADA: document technique – Les coliformes totaux**. Bureau de la Qualité de L'eau et de la Santé Direction Générale de la Santé Environnementale et de la Sécurité des Consommateurs. Santé Canada, Ottawa (Ontario), 2006.
9. THOMANN, R.V; MULLER, J.A. Principles of Surface water Quality Modelling and Control Harper & Row, New York, 1987.
10. WATTERWORTH, L.; TOPP, E. ; SCHRAFT, H. et LEUNG, K.T. **Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic *Escherichia coli***. *Journal of Microbial Methods* v.60, n.1, Jan, p. 93-105, 2005.
11. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for Safe Recreational Water Environments, Coastal and Fresh Waters**. Geneva, Switzerland, Vol. 1, 2009.