

COLIFORMES FECAIS EM ÁGUAS DE ESGOTO. I. RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS, METAIS PESADOS E COLICINOGENIA

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

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

Fecal coliforms in sewage treatment. I Antibiotic and heavy metal resistance and colicinogeny – *Qualitative bacteriological analysis was carried out in two sewage treatment plants in the city of Rio de Janeiro during the period 1984-1985. Specific points of the plants were selected for the collection of affluent and effluent samples.*

The study involved the isolation and the identification of 540 cultures of Escherichia coli that were analyzed for their resistance to eight antibiotics (sulfadiazine, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol, kanamycin, ampicilin, nalidixic acid and gentamycin), and three heavy metals (copper sulphate, mercuric chloride and zinc sulphate) as well as colicinogeny.

About 95% of the isolated cultures from the effluents had genetic markers while the samples originated from the affluents showed 70%

Key words: sewage treatment – *Escherichia coli* – antibiotic and heavy metal resistances – colicins

O uso difundido de drogas antimicrobianas pelo homem nas quatro últimas décadas, assim como, o lançamento contínuo de resíduos tóxicos no meio ambiente (metais pesados), provavelmente acarretou uma seleção de amostras bacterianas resistentes quer a antibióticos e ou íons metálicos favorecendo, por conseguinte, a prevalência destas bactérias em diferentes nichos ecológicos da biosfera (Anderson, 1968; Foster, 1983 e Spiegel et al., 1985).

Tais características estão muitas vezes associadas a plasmídeos, que podem ser transferidos até entre bactérias de grupos taxonômicos distintos (Broda, 1979). A investigação de bactérias com determinantes genéticos é um elemento fundamental para elucidar os mecanismos de disseminação desses fatores entre as bactérias constituintes de diferentes biomas (OMS, 1978).

Conquanto seja reconhecida a importância das análises de cunho genético no campo da Microbiologia, a avaliação da eficiência de um sistema de tratamento de esgotos ainda se respalda nos processos bacteriológicos clássicos de ordem quantitativa. Assim, segundo Pessoa & Jordão (1982) efetiva-se sua medida pela redução do número de coliformes presentes no efluente.

Associando os dois parâmetros abordados, alguns autores analisaram a distribuição e as possíveis conseqüências de coliformes resistentes a antimicrobianos em águas, como por

exemplo nas de estações de tratamento de esgotos e de rios e lagoas, que recebem o lançamento de efluentes, destacando-se as observações de Grabow et al. (1973); Bell et al. (1983); e Al-Jebouri (1985). Por outro lado Varma et al. (1976) e Cenci et al. (1985) estudaram o problema da tolerância de coliformes aos metais pesados.

Em nosso meio as análises nesse campo ainda são muito discretas, concentrando-se essencialmente no isolamento e caracterização de certas enterobactérias patogênicas (Hofer & Costa, 1972 e Sato et al., 1983) e na detecção de marcadores genéticos em *Salmonella* (Câmara et al., 1982 e Solari et al., 1986).

Deste modo, com o intuito de se avaliar o problema desenvolveu-se uma pesquisa abordando a frequência e estabilidade de marcadores genéticos em culturas de *Escherichia coli* originárias de afluentes e efluentes, de estações de tratamento de esgotos, em dois locais distintos da cidade do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita – foram escolhidas duas estações de tratamento para a obtenção das amostras de águas de esgoto; as Estações de Tratamento de Esgotos da Ilha do Governador (ETIG) e da Penha (ETEP), localizadas no município do Rio de Janeiro, RJ. A ETIG processa o sistema de lodo ativado, enquanto a ETEP além deste, inclui o sistema de filtração biológica. Na ETIG determinou-se como pontos referenciais de colheita, o afluente e os efluentes do decantador e do digestor secundários, acrescentando-se, no caso de ETEP, o efluente do sistema de filtro biológico. As colheitas das

Trabalho realizado com suporte financeiro do FIPEC-Banco do Brasil (Projeto nº 1.1362-5).

Recebido em 6 de outubro de 1986.

Aceito em 10 de junho de 1987.

amostras foram efetuadas com base nas técnicas descritas pela "American Public Health Association", APHA (1980), recolhendo-se volumes de cerca de 100 ml em frascos estéreis, acondicionando-os em isopor contendo gelo para o transporte ao laboratório.

Colimetria – preliminarmente, as amostras coletadas, sofreram as seguintes diluições: afluentes - 10^{-6} e 10^{-7} ; efluentes do decantador e digestor secundários - 10^{-4} e 10^{-5} e efluente do sistema de filtro biológico da ETEP - 10^{-4} e 10^{-5} . Tendo por base os fatores de diluição e seguindo as recomendações da APHA (1980) para a determinação colimétrica utilizou-se o processo de fermentação em tubos múltiplos.

O meio empregado foi o Caldo Lauryl Sulfato Tryptose (Difco), distribuído em volumes de 10 ml e a incubação realizada a 37°C por 24-48 h.

Dos tubos positivos observados no teste presuntivo, quantidades correspondentes a uma alça de platina foram semeadas em tubos contendo EC Medium (Difco) com tubos de Durham e incubados em banho-maria a 44,5°C \pm 0,1°C por 24 h.

A leitura, quer no teste presuntivo como confirmativo, foi realizada através da verificação de gás, obtendo-se na Tabela de Mac Grady (in APHA, 1980) uma codificação correspondente ao número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais, respectivamente.

Isolamento e identificação – uma alça de platina de material *in natura* e dos crescimentos nos tubos positivos do teste presuntivo (com correspondência aos tubos positivos da colimetria confirmativa) foi semeada em placas de Agar EMB (Difco) e incubada a 37°C por 24 h. Das placas foram selecionadas as colônias com brilho metálico (Lac +), transferindo-as para o meio de Costa & Vérnin e, posteriormente caracterizadas bioquimicamente segundo Edward & Ewing (1972).

Conservação das amostras – as culturas de *E. coli* crescidas em caldo BHI (Difco) com 20% de glicerol foram mantidas a -15°C.

Antibiograma – foi efetuado segundo a técnica de Bauer et al. (1966), utilizando-se discos do laboratório Cecon, com as seguintes drogas: sulfadiazina, 300 μ g (Su); estreptomina, 10 μ g (Sm); tetraciclina, 30 μ g (Tc); cloranfenicol, 30 μ g (Cm); canamicina, 30 μ g (Km); ampicilina, 10 μ g (Ap); gentamicina, 10 μ g (Gm) e ácido nalidíxico, 30 μ g (Nal).

Resistograma – inicialmente, se executou uma análise experimental visando determinar a concentração mínima inibitória (CMI) em culturas de referência (*Escherichia coli* K 12

C 600 – "Central Public Health Laboratory", Colindale, Inglaterra; *Escherichia coli* K 12 PCG 86 – Instituto de Genética, ESALQ, São Paulo e *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) e o comportamento em diferentes meios de cultura na detecção da resistência a metais pesados. Esta etapa foi realizada de acordo com as orientações de Elek & Higney (1969) e Morozzi et al (1982).

Com conseqüência dos resultados obtidos nos ensaios preliminares, o resistograma foi realizado pela semeadura de uma alça do crescimento de 24 h a 37°C em Caldo Nutriente (Difco) para Agar Nutriente (Difco), acrescido de soluções aquosas dos metais, que proporcionaram as seguintes concentrações finais: 200 μ g/ml de sulfato de cobre (Cu) - Mast; 5 μ g/ml de cloreto de mercúrio (Hg) - Baker & Adamson e 100 μ g/ml de sulfato de zinco (Zn) - Baker Analysed Reagent. Procedeu-se à incubação a 37°C por 24 h. Após esta etapa, a leitura era realizada considerando a resistência pelo crescimento de colônias nas placas com soluções dos metais.

Colicinogenia e colicinotipia – empregou-se a técnica de Ozeki et al. (1962) recorrendo-se às linhagens padrão de *E. coli* originárias do "Central Public Health Laboratory", Colindale, Inglaterra.

Análise estatística – aplicou-se o teste não paramétrico de χ^2 (quiquadrado), adotando-se o nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

RESULTADOS

A Tabela I dispõe de forma genérica os resultados da pesquisa de marcadores genéticos nas 540 culturas de *E. coli*, correlacionando-os ao total de amostras isoladas em cada setor de coleta. Destacam-se em particular as taxas mais elevadas daquelas culturas com marcadores advindas dos efluentes. As diferenças obtidas entre as amostras originárias do afluente e as do efluente do decantador secundário foram significativas em relação à ETIG ($p < 0,01$) e às isoladas da ETEP ($p < 0,05$).

Os dados obtidos referentes ao antibiograma, resistograma e pesquisa de colicina estão discriminados, respectivamente, nas Tabelas II, III e IV. Salienta-se a distribuição dos percentuais mais expressivos de culturas isoladas dos efluentes do que de afluentes. Neste sentido a resistência a antibióticos revelou uma significância ($p < 0,01$), considerando as diferenças obtidas para as amostras advindas do afluente e efluente do decantador secundário da ETEP, embora não compartilhada pelas culturas oriundas da ETIG (Tabela II). Resultado estatístico inverso

se observou para a resistência aos metais (Tabela III) onde houve diferença significativa apenas para as amostras da ETIG ($p < 0,01$). No tocante à produção de colicina (Tabela IV) os coliformes isolados das duas estações apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$).

Nas Tabelas V e VI se correlacionam os padrões numéricos de resistência aos antimicrobianos e metais pesados, com os marcadores genéticos mais freqüentes, considerando as culturas de *E. coli* por origem.

De modo geral os isolamentos dos efluentes mostraram maior número de marcadores por amostra, contrapondo-se àqueles originários dos afluentes, assinalando-se o mesmo resultado em relação à freqüência desses determinantes genéticos.

DISCUSSÃO

Pondera-se, inicialmente, que em relação à colimetria, os resultados apresentaram compatibilidade com as medições efetivadas pelas estações de tratamento, isto é, os valores de NMP

para coliformes totais e fecais comprovaram a redução de tais bactérias nos efluentes.

Mesmo com a obtenção destes achados é importante se acrescentar que em tais medições há interferência de vários fatores, como a sazonalidade (Martins, 1979) e lançamento clandestino de descargas, possivelmente de origem industrial, que segundo informações dos técnicos das Estações provocaram problemas no processamento, durante um período de coleta. Além disso, recorda-se que tais sistemas de tratamento foram previamente montados para atender somente ao despejo doméstico.

Quanto à pesquisa de marcadores genéticos nas culturas de *Escherichia coli*, a Tabela I mostra maiores percentuais para as amostras originárias dos efluentes, tanto da ETIG como da ETEP. É oportuno destacar que na abordagem estatística considerou-se apenas os coliformes isolados dos afluentes e efluentes do decantador secundário, uma vez que são setores comuns nas estações e têm o mesmo destino. Também através da determinação dos níveis de significância obtidos para *E. coli* (Tabela I) ficou evidente a homogeneidade na distribuição dessas bactérias com marcadores genéticos nas duas estações.

TABELA I

Distribuição numérica e percentual das culturas de *Escherichia coli* portadoras de marcadores genéticos isoladas de águas de esgoto

Estação	Setor	Número de culturas isoladas	Culturas com marcadores genéticos	
			Nº	%
Ilha do Governador*	Afluente	80	57	71,2
	Efluente do decantador secundário	80	76	95,0
	Efluente do digestor secundário	80	72	90,0
Penha**	Afluente	80	58	72,5
	Efluente do decantador secundário	80	72	90,0
	Efluente do digestor secundário	60	47	78,3
	Efluente do sistema de filtro biológico	80	58	72,5

* $\chi^2 = 19,62$ ($p < 0,01$)

** $\chi^2 = 9,76$ ($p < 0,05$)

TABELA II

Frequência de resistência a drogas antimicrobianas em culturas de *Escherichia coli* isoladas de águas de esgoto

Estação de tratamento	Setor	Número de culturas isoladas	Culturas resistentes	
			Nº	%
Ilha do Governador*	Afluente	80	28	35,0
	Efluente do decantador secundário	80	29	36,2
	Efluente do digestor secundário	80	38	47,5
Penha**	Afluente	80	28	35,0
	Efluente do decantador secundário	80	42	52,5
	Efluente do digestor secundário	60	41	68,3
	Efluente do sistema de filtro biológico	80	56	70,0

* $\chi^2 = 3,16$ ($p > 0,05$)

** $\chi^2 = 19,67$ ($p < 0,01$)

TABELA III

Frequência de resistência a metais pesados em culturas de *Escherichia coli* isoladas de águas de esgoto

Estação de tratamento	Setor	Número de culturas isoladas	Culturas resistentes	
			Nº	%
Ilha do Governador*	Afluente	80	26	32,5
	Efluente do decantador secundário	80	31	38,7
	Efluente do digestor secundário	80	55	68,7
Penha**	Afluente	80	37	46,2
	Efluente do decantador secundário	80	33	41,2
	Efluente do digestor secundário	60	35	58,3
	Efluente do sistema de filtro biológico	80	40	50,0

* $\chi^2 = 24,19$ ($p < 0,01$)

** $\chi^2 = 1,35$ ($p > 0,05$)

TABELA IV

Frequência de colicinogenia e colicinotipia em culturas de *Escherichia coli* isoladas de águas de esgoto

Estação de tratamento	Setor	Número de culturas isoladas	Culturas colicinogênicas		Perfil colicinogênico
			Nº	%	
Ilha do Governador*	Afluentes	80	2	2,5	V (2) +
	Efluente do decantador secundário	80	30	37,5	V (10); I _a , I _b , V (20)
	Efluente do digestor secundário	80	10	12,5	E ₂ (1); E ₁ , E ₂ (1); E ₁ , E ₂ , V (3); E ₁ , E ₂ , I _b , V (1); I _b , V (4).
Penha**	Afluentes	80	0	0,0	—
	Efluente do decantador secundário	80	20	25,0	V (13); E ₁ (4); E ₁ , V (2); I _b , V (1)
	Efluente do digestor secundário	80	4	6,6	V (3); I _a , V (1)
	Efluente do sistema de filtro biológico	80	5	6,2	V (2); E ₁ , E ₂ , V (3)

+ Os números entre parênteses exprimem o valor numérico de cada perfil.

* $\chi^2 = 36,00$ ($p < 0,01$)** $\chi^2 = 30,86$ ($p < 0,01$)

TABELA V

Distribuição dos padrões numéricos e marcos de resistência a antimicrobianos em culturas de *Escherichia coli* isoladas de águas de esgoto

Estação	Setor	Expressão numérica de resistência								Marcos mais frequentes
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Ilha do Governador	Afluentes	7	16	2	2	1	—	—	—	Sm (20,0)*; Su (13,5); Tc (13,5)
	Efluente do decantador secundário	6	6	—	6	2	2	4	3	Tc (33,7); Sm (26,2); Ap (22,5)
	Efluente do digestor secundário	5	5	3	10	6	4	4	1	Cm (28,7); Su (27,5); Ap (27,5)
Penha	Afluentes	15	9	3	1	—	—	—	—	Tc (27,5); Su (7,5); Ap (7,5)
	Efluente do decantador secundário	12	4	4	5	7	8	2	—	Tc (51,2); Ap (33,7); Km (27,5)
	Efluente do digestor secundário	2	3	5	22	5	3	1	—	Tc (66,6); Ap (63,3); Su (53,3)
	Efluente do sistema de filtro biológico	24	6	7	6	4	7	2	—	Tc (60,0); Ap (33,7); Km (25,0)

* Os números entre parênteses exprimem percentuais.

TABELA VI

Distribuição dos padrões numéricos e marcos de resistência a metais pesados em culturas de *Escherichia coli* isoladas de águas de esgoto

Estação	Setor	Expressão numérica de resistência			Marcos mais freqüentes
		1	2	3	
Ilha do Governador	Afluente	22	4	—	Zn (27,5) *
	Efluente do decantador secundário	29	2	—	Zn (20,0)
	Efluente do digestor secundário	31	20	4	Cu (38,7); Zn (38,7)
Penha	Afluente	37	—	—	Zn (36,2)
	Efluente do decantador secundário	30	3	—	Zn (25,0)
	Efluente do digestor secundário	28	7	—	Cu (46,6)
	Efluente do sistema de filtro biológico	36	4	—	Zn (38,7)

* Os números entre parênteses exprimem percentuais.

No problema da resistência dos coliformes aos antimicrobianos verifica-se na Tabela II que tal uniformidade anteriormente assinalada não apresenta uma característica generalizada.

Quanto à projeção de freqüências das culturas resistentes isoladas dos efluentes é interessante ainda mencionar que Bell (1978) e Bell et al. (1983) obtiveram resultados inversos. Entretanto, os achados de Bell et al. (1981) sobre a incidência de fatores R em diferentes estações de tratamento do Canadá apresentam similaridade com os nossos dados. Os referidos autores tentam explicar o fenômeno do aumento progressivo de cepas R + nos efluentes, através da maior capacidade de sobrevivência dessas estirpes aos processos de tratamento em estações de esgoto. Embora se valorize tal hipótese, admite-se que outros fatores também participem no problema. Assim é oportuno assinalar as conseqüências de despejos na rede de esgotos dos resíduos de indústrias farmacêuticas e de hospitais. Outra suposição poderia estar relacionada à produção de substâncias ou princípios antibióticos *in loco*, por alguns constituintes dessa microbiota, principalmente *Streptomyces* e *Bacillus*, como foi assinalada por Schomburg & Müller (1984).

Para o resistograma os resultados obtidos (Tabela III) são semelhantes ao antibiograma, ou seja, maiores percentuais de resistência nas culturas dos efluentes, com exceção daquelas relacionadas aos efluentes do decantador secundário da ETEP. Aliás, a distribuição de coliformes resistentes aos metais pesados foi heterogênea nas duas estações, reconhecendo-se apenas uma diferença significativa nas amostras da ETIG.

No que se refere à pressão seletiva de metais pesados sobre a microflora originalmente resistente nos afluentes (32,5% para a ETIG e 46,2% para a ETEP — Tabela III) é viável admitir que a ação corrosiva de natureza microbiana sobre o maquinário de diferentes setores das estações provoque a dissociação de compostos metálicos e respectivos íons (Gainey & Lord, 1952), que agiriam no processo de seleção de estirpes (Cynamon, comunicação pessoal). Ainda sob este enfoque enfatiza-se possibilidade da rede de esgoto receber, clandestinamente, dejetos industriais. Tal suposição se reforça pelo fato de que em locais adjacentes às estações, algumas indústrias empregam metais e substâncias afins em sua linha de produção.

Por outro lado a prevalência de coliformes fecais resistentes a antimicrobianos nos efluentes pode ser uma consequência da pressão seletiva de íons, aludida anteriormente, pois as investigações por diversos autores em diferentes estudos (Timoney et al., 1978; Foster, 1983 e Pereira et al., 1985) apontam a relação entre os determinantes genéticos de resistência a metais pesados com plasmídeos R.

Com relação à colicinogenia (Tabela IV) observa-se a discreta ocorrência de *E. coli* com esta característica, quando oriunda do afluente da ETIG e a ausência desse marcador nas cepas do mesmo setor da ETEP. Resultados semelhantes foram assinalados por Dhillon & Dhillon (1981) em *E. coli* de diferentes fontes, inclusive de esgoto doméstico. Por outro lado, a emergência de culturas colicinogênicas nas fases de processamento é típico em função do papel ecológico das cepas produtoras de colicina, cuja população aumenta em relação às cepas não produtoras, que de um modo geral podem ser sensíveis à ação dos diferentes tipos de colicina. Outra explicação plausível para esta progressão pode estar relacionada à disseminação dos genes Col entre os coliformes fecais. Como embasamento para tal hipótese advoga-se o nível de significância observado nas amostras dos afluentes e efluentes do decantador secundário (ETIG e ETEP), caracterizando nitidamente uma distribuição homogênea de coliformes colicinogênicos nas duas estações.

Nos dados da Tabela IV, destaca-se ainda a frequência de amostras produtoras de Col V. Este colicínótipo está associado, segundo Binns et al. (1979), à virulência em *E. coli*, assim como, à maior capacidade de sobrevivência da bactéria em estações de tratamento de esgotos, como aponta Rowbury (1985).

A magnitude do problema exposto se amplia à medida que se pormenorizam os dados da Tabela V, onde impressionam os padrões numéricos de resistência aos antibióticos obtidos. Assim, nos efluentes da ETIG se detectam culturas até octoresistentes, como também nos efluentes da ETEP observa-se resistência até sete marcos. Em contraposição, nas amostras isoladas dos afluentes das estações, predominam modelos de resistência inferiores.

Entre os determinantes genéticos de resistência mais frequentes, percebe-se uma circulação comum de Su, Sm, Tc, Cm e Ap na ETIG, distinguindo-se das culturas da ETEP, apenas pela substituição de Cm por Km. Esses resultados se assemelham com aqueles apresentados por Grabow et al. (1973) e Bell et al. (1983).

Para os metais é interessante a distribuição quase que equitativa de culturas com padrão monoresistente nos diferentes setores das duas estações, excetuando-se as amostras isoladas do afluente da ETEP e do efluente do digestor secundário da ETIG (Tabela VI). No último caso o achado apresenta maior expressão, pois denota-se também a resistência simultânea aos três metais.

No que se refere à circulação dos marcadores de resistência aos metais nas duas estações identifica-se a predominância de Cu e Zn.

Entre as várias repercussões, tanto de ordem ecológica como sanitária, da circulação no meio ambiente de amostras resistentes a metais pesados, salienta-se o problema do destino do efluente do digestor secundário. No caso específico da ETIG, após o processamento em leitos de secagem, o produto resultante é empregado na adubação de hortaliças e jardins de praças públicas.

Em síntese, outras investigações devem ser incentivadas no sentido de se esclarecer os pontos críticos nas estações de tratamento, onde provavelmente ocorre a seleção e ou aquisição de marcadores genéticos. Além deste aspecto é importante reavaliar as proposições de Grabow et al. (1974) sobre os padrões de qualidade da água, acrescentando-se outras observações sobre a aplicação de sistemas complementares nos efluentes antes de seu lançamento ao meio ambiente ou de sua utilização.

RESUMO

Coliformes fecais em águas de esgoto. I Resistência a antibióticos, metais pesados e colicinogenia. Análise bacteriológica de ordem qualitativa foi desenvolvida em duas estações de tratamento de esgoto da cidade do Rio de Janeiro no período de 1984 a 1985.

A pesquisa considerou o isolamento e a identificação de 540 culturas de *Escherichia coli*, advindas de afluentes e efluentes. Estudou-se a resistência a oito antimicrobianos (sulfadiazina, estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, ampicilina, ácido nalidíxico e gentamicina) e a três metais pesados (sulfato de cobre, cloreto de mercúrio e sulfato de zinco), além da colicinogenia.

Foi possível a detecção de percentuais até 95 para culturas isoladas dos efluentes com marcadores genéticos, contrapondo-se com taxas ao redor de 70% para aquelas provindas dos afluentes.

Palavras-chave: água de esgoto – *Escherichia coli* – resistência a antibióticos e metais pesados – colicinas

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sachna Elias Cynamon, da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, pelos incentivos e auxílio na análise de dados durante a realização do Projeto.

Aos Srs. Chefes das Estações de Tratamento de Esgotos da Ilha do Governador e da Penha, Dra. Ângela Maria Pinheiro dos Santos e Dr. Luiz de Paula Meirelles, pelas facilidades propiciadas na fase de coleta de material.

Ao Prof. Pedro Carvalho Rodrigues, do Departamento de Saúde da Comunidade, da Universidade Federal Fluminense, pela valiosa contribuição na análise estatística.

Aos Srs. Técnicos do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, Evaldo Soares da Silva, Deise Paranhos, Maria Severina Pinheiro e Emilson Domingos da Silva, pela dedicação 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.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1980. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 15 ed.
- ANDERSON, E.S., 1968. The ecology of transferable drug resistance in the *Enterobacteriaceae*. *Ann. Microbiol.*, 22 :131-180.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45 :493-496.
- 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.; ELLIOTT, G.E. & SMITH, D.W., 1983. Influence of Sewage Treatment and Urbanization on Selection of Multiple Resistance in Fecal Coliform Populations. *Appl. Environm. Microbiol.*, 46 :227-232.
- BELL, J.B.; MACRAE, W.R. & ELLIOTT, G.E., 1981. R Factors in Coliform Fecal-Coliform Sewage Flora of the Prairies and Northwest Territories of Canada. *Appl. Environm. Microbiol.*, 42 :204-210.
- BINNS, M.M.; DAVIES, D.L. & HARDY, K.G., 1979. Cloned fragments of the plasmid Col V, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature*, 279 :778-781.
- BRODA, P., 1979. Plasmids. W.H. Freeman and Company Limited. San Francisco, USA.
- CÂMARA, F.P.; COSTA, G.A.; HOFER, E. & ALMEIDA, D.F., 1982. Drug resistance in *Salmonella* strain isolated from raw sewage in Rio de Janeiro. *Rev. Brasil. Biol.*, 42 :421-424.
- CENCI, G.; MOROZZI, G. & CALDINI, G., 1985. Injury by Heavy Metals in *Escherichia coli*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 34 :188-195.
- 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. Environm. Microbiol.*, 41 :894-902.
- EDWARDS, P.R. & EWING, W.H., 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd. ed. Burgess Publ. Co. Minnesota, USA.
- ELEK, S.D. & HIGNEY, L., 1970. Resistogram Typing - A New Epidemiological Tool: Application to *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 3 :103-110.
- FOSTER, T.J., 1983. Plasmid-Determined Resistance to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria. *Microbiol. Rev.*, 47 :361-409.
- GAINEY, P.L. & LORD, T.H., 1956. Microbiology of Water and Sewage. Prentice-Hall, Inc. 3rd. ed. New Jersey, USA.
- GRABOW, W.O.K.; MIDDENDORFF, I.G. & PROZESKY, O.W., 1973. Survival in Maturation Ponds of Coliform Bacteria with Transferable Drug Resistance. *Water Res.*, 7 :1589-1597.
- GRABOW, W.O.K.; PROZESKY, O.W. & SMITH, L.S., 1974. Drug Resistant Coliforms Call for Review of Water Quality Standards. *Water Res.*, 8 :1-9.
- HOFER, E. & COSTA, G.A., 1972. Investigação sobre a ocorrência de *Salmonella* em esgotos sanitários da cidade do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 70 :221-236.
- MARTINS, M.T., 1979. *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. Tese de Doutorado. USP, São Paulo, SP.
- MOROZZI, G.; CENCI, G. & CALDINI, G., 1982. The Tolerance of an Environmental Strain of *Escherichia coli* to Some Heavy Metals. *Zbl. Bakt. Hyg.*, I. Abt. Orig. B. 176 :55-62.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS, 1978. Vigilancia para prevenir y combatir los riesgos sanitarios provocados por las enterobacterias resistentes a los antibióticos. Serie de Informes Técnicos nº 624.
- OZEKI, H.; STOCKLER, B.A.D. & SMITH, S.M., 1962. Transmission of colicinogeny between strains of *Salmonella typhimurium* grown together. *J. Gen. Microbiol.*, 28 :671-687.
- PEREIRA, J.A.A.; COTRIM, P.B.S.R. & SUASSUNA, I., 1985. Resistência a antibióticos e íons inorgânicos em *Klebsiella pneumoniae* de pacientes hospitalizados e não hospitalizados. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 16 :245-246.
- PESSOA, C.A. & JORDÃO, E.C., 1982. Tratamento de Esgotos Domésticos. Vol. I. ABES. 2ª ed. Rio de Janeiro, RJ.
- 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 São Paulo, Brazil. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 14 :276-281.
- SCHOMBURG, I. & MULLER, H.E., 1984. Über die Bedeutung Antibiotika-bildender Mikroorganismen bei der biologischen Abwasserklärung. *Zbl. Bakt. Hyg.*, I. Abt. Orig. B 179 :162-169.

- SOLARI, C.A.; REIS, E.M.F.; DIAS, J.C. de A.R. & HOFER, E., 1986. Resistência antimicrobiana de *Salmonella agona* oriunda de várias regiões do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81 :7-14.
- SPIEGEL, S.J.; FARMER, J.K. & GARVER, S.R., 1985. Heavy Metal Concentrations in Municipal Wastewater Treatment Plant Sludge. *Bull. Environm. Contamin. Toxicol.*, 35 :38-43.
- 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. Environm. Microbiol.*, 36 :465-472.
- VARMA, M.M.; THOMAS, W.A. & PRASAD, C., 1976. Resistance to Inorganic Salts and Antibiotic Among Sewage-borne *Enterobacteriaceae* and *Achromobacteriaceae*. *J. Appl. Bacteriol.*, 41 :347-349.