

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA  
A ANTIMICROBIANOS E METAIS PESADOS EM MICRO-ORGANISMOS  
ISOLADOS DO RIO DOS SINOS/RS.**

**ANA BÁRBARA BARTH HAHN**

**Bióloga – UFRGS**

**Junho de 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA  
A ANTIMICROBIANOS E METAIS PESADOS EM MICRO-ORGANISMOS  
ISOLADOS DO RIO DOS SINOS/RS**

Ana Bárbara Barth Hahn  
Bióloga – UFRGS

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos para a obtenção do grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do  
Ambiente.

Porto Alegre, RS, Brasil  
Junho, 2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Hahn, Ana Bárbara Barth  
Avaliação do perfil de resistência a  
antimicrobianos e metais pesados em micro-organismos  
isolados do Rio dos Sinos/RS. / Ana Bárbara Barth  
Hahn. -- 2014.  
76 f.

Orientadora: Sueli Van Der Sand.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Resistência a metais pesados. 2. Resistência a  
antimicrobianos. 3. Qualidade da água. 4. Rio dos  
Sinos. I. Van Der Sand, Sueli , orient. II. Título.

## **Agradecimentos**

A Deus, que me deu fé inabalável que tudo daria certo.

A Dra. Sueli Van Der Sand, pela orientação, pelo carinho e, principalmente, por ter apostado e confiado em mim.

A minha família, que possibilitou esse sonho, apostando e investindo em mim. Meu amado pai e assistente de campo, pela ajuda e paciência; a minha querida mãe por sempre acreditar em mim; minha irmã Clarissa, que mesmo de longe sempre deu suporte; minha irmã Cássia – também ajudante de campo – pela força, ajuda técnica e científica.

A todas as amigas do Laboratório 164, pela ajuda, amizade e por não terem me expulsado, apesar da minha bagunça, em especial a Paulinha, Ana Basso, Themis e Cris.

As minhas queridas Marianas, que apesar do pouco tempo, me ajudaram muito, permitindo que o trabalho andasse; e a amada Bibiana, pela imensa ajuda e tamanha dedicação.

A Karina Heck da Silva, por ter me recebido tão bem e me ensinado o amor pela microbiologia.

As minhas amigas Clarisse Cardoso, Graziela Cansi e Christina Farias, por entenderem minha ausência e sempre me incentivarem.

Aos professores do PPGMAA que contribuíram para o meu aprendizado.

A Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) e a COMUSA-Serviços de água e esgoto de Novo Hamburgo, pelas possibilidades das coletas de água.

A CAPES, pelo apoio financeiro durante o período de pesquisas.

# **AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E METAIS PESADOS EM MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DO RIO DOS SINOS/RS<sup>1</sup>**

Autor: Ana Bárbara Barth Hahn

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sueli Van Der Sand

## **Resumo**

A bacia do Rio dos Sinos banha total ou parcialmente 32 municípios e integra uma área territorial de 3.600 km<sup>2</sup>. Ao longo do seu curso, recebe vários tipos de dejetos oriundos de esgoto pluvial, doméstico e industrial. Sendo assim, o Rio recebe uma população microbiana bastante diversificada, possibilitando a presença de micro-organismos com fenótipo de resistência a diferentes antimicrobianos e a metais pesados. O objetivo principal desse estudo foi avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados de bactérias isoladas no Rio dos Sinos. Foram testados 410 micro-organismos isolados das águas do Rio nos municípios de Três Coroas, Novo Hamburgo e Esteio, nas quatro estações do ano. O ensaio de susceptibilidade foi realizado com 13 antimicrobianos. Todos os isolados foram submetidos aos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) de metais pesados, os metais utilizados foram cromo, cobre e níquel. Foram também realizados testes de colimetria e contagem total de heterotróficos. Os resultados apontaram para um perfil de 77,32% dos isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano. O antimicrobiano com maior índice de resistência foi a vancomicina com 64,15% dos isolados e o mais eficiente foi o imipenem, com apenas cinco isolados resistentes. Quanto aos ensaios com metais pesados 44,39% dos isolados foram resistentes a um MIC acima de 802,27 mg/L de níquel, 40,97% foram resistentes a MIC acima de 509,24 mg/L para cobre e 12,92% dos micro-organismos foram resistentes MIC acima de 707,04 mg/L de cromo. Conforme a maioria dos resultados, as águas do Rio dos Sinos seriam classificadas como classe 3 pelas normas do CONAMA.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

## **EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND HEAVY METAL RESISTANCE PROFILE OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM RIO DOS SINOS/RS<sup>1</sup>**

Author: Ana Bárbara Barth Hahn

Advisor: Dr. Sueli Van Der Sand

### **Abstract**

The Rio dos Sinos basin, covers wholly or partly 32 municipalities and a land area of 3,600 km<sup>2</sup>. Along its course, receives various types of waste arising from pluvial, domestic and industrial sewage. Hence, Rio dos Sinos receives a quite diverse microbial population, allowing for the presence of micro-organisms with resistance phenotype to different antibiotics and heavy metals. The main objective of this study was to evaluate the antimicrobial and heavy metals resistance profile of the bacteria isolated in Rio dos Sinos. 410 isolated micro-organisms were tested from the municipalities of Rio Três Coroas, Esteio and Novo Hamburgo, in four seasons. The assay was performed with 13 antimicrobials. All isolates were subjected to the tests of minimum inhibitory concentration (MIC) of heavy metals, using chromium, copper and nickel. Were also held colimetries and heterotrophic bacterial count. Results showed a profile of 77.32% of the isolates were resistant to at least one antimicrobial. The antimicrobial with the highest rate of resistance was vancomycin (64.15%) and the most efficient was imipenem, with only five resistant isolates. The bacteria isolated in this study shows that 44.39% were resistant to MIC above 802.27 mg/L of nickel, 40.97% were resistant to MIC above 509.24 mg/L of copper and 12.92% microorganisms were resistant to MIC above 707.04 mg/L of chromium. According to most of the results, the waters of the Rio dos Sinos would be classified as Class 3 standards by CONAMA.

<sup>1</sup>Master Degree Dissertation in Agriculture and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Água.....	3
2.2 Qualidade da água.....	4
2.3 Rio dos Sinos.....	7
2.4 Metais pesados.....	11
2.5 Resistência a metais pesados e antimicrobianos .....	14
3. Materiais e métodos.....	17
3.1 Pontos de coleta das amostras.....	17
3.2 Coleta das amostras.....	17
3.3 Semeadura e isolamento bacteriano.....	18
3.4 Quantificação de bactéria heterotróficas.....	18
3.5 Colimetria – Método de Fermentação em Tubos Múltiplos.....	19
3.6 Análises físico-químicas.....	19
3.7 Teste de resistência a antimicrobianos.....	19
3.8 Teste de concentração inibitória mínima para metais pesados (MIC).....	20
3.9 Identificação.....	22
4. Resultados e discussão.....	23
4.1 Teste colimétrico – Fermentação em tubos múltiplos.....	23
4.2 Determinação do número de bactérias heterotróficas.....	28
4.3 Parâmetros físico-químicos.....	29
4.4 Perfil de resistência a antimicrobianos.....	34
4.5 Identificação dos isolados resistentes a cinco ou mais classes de antimicrobianos.....	41
4.6 Concentração inibitória mínima (CIM) de metais pesados.....	44
5. Conclusões.....	53
6. Perspectivas.....	54
7. Referências bibliográficas.....	55
8. Anexos.....	64

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Municípios pertencentes à Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos.....	9
TABELA 2. Número mais provável (NMP) de coliformes totais, termotolerantes dos diferentes pontos de coleta no Rio dos Sinos.....	27
TABELA 3. Contagem de bactérias heterotróficas (UFC/100µL) no diferentes pontos do Rio dos Sinos.....	30
TABELA 4. Análises físico-químicas das águas do Rio dos Sinos referentes à primeira (inverno) e quarta coleta (outono).....	31
TABELA 5. Perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados e identificação dos micro-organismos.....	42

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mapa esquemático do Rio dos Sinos.....	8
FIGURA 2. Índices pluviométricos no município de Porto Alegre no ano de 2011.....	26
FIGURA 3. Índices pluviométricos no município de Porto Alegre no ano de 2012.....	28
FIGURA 4. Frequência de resistência e resistência múltipla a antimicrobianos de bactérias isolados do Rio dos Sinos.....	36
FIGURA 5. Número de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos utilizados nos ensaios de susceptibilidade.....	37
FIGURA 6. Perfil de resistência dos isolados ao metal cromo.....	48
FIGURA 7. Perfil de resistência dos isolados ao metal cobre.....	51
FIGURA 8. Perfil de resistência dos isolados ao metal níquel.....	53

## Lista de abreviaturas

Km<sup>2</sup>: quilômetros quadrados

km<sup>3</sup>: quilômetros cúbicos

mg.Kg<sup>-1</sup>: miligrama por quilograma

mg.L<sup>-1</sup>: miligrama por litro

ml: mililitro

CIM: concentração inibitória mínima

NMP: número mais provável

pH: potencial de hidrogênio

rpm: rotações por minuto

UFC: unidade formadora de colônia

μL: microlitro

°C: grau Celsius

## 1. Introdução

A água é parte integral do planeta Terra, componente fundamental de dinâmica da natureza, impulsiona todos os ciclos, sustenta a vida e é o solvente universal. No universo, a água é o recurso mais importante em todos os aspectos da vida; em excesso, ela causa inundações e calamidades ambientais e sua escassez provoca fome e miséria. O manejo adequado da água pode conduzir a excelentes resultados na produção de alimentos, porém seu mau uso provoca degeneração do meio físico natural.

A maioria dos países tem conhecimento dos próprios problemas de disponibilidade e uso dos recursos naturais. No entanto, há muitas dificuldades para resolvê-los ou evitá-los e para estabelecer programas de preservação dos recursos.

A água de consumo humano é um dos importantes veículos de enfermidades diarreicas de natureza infecciosa, o que torna primordial a avaliação de sua qualidade microbiológica.

A bacia do Rio dos Sinos tem suas nascentes localizadas na região meridional da Serra Geral, abrange total ou parcialmente 32 municípios e integra uma área territorial de 3.600 km<sup>2</sup>. No percurso superior, o rio ainda apresenta boa qualidade de água, e no curso inferior a sua qualidade está comprometida pela entrada de poluentes oriundos de uma grande área, densamente habitada, onde ainda resíduos domésticos e industriais são

lançados na rede hídrica sem tratamento adequado ([http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade\\_sinos/sinos.asp](http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade_sinos/sinos.asp)). Ao longo dos anos inúmeras empresas, de porte muito variado, foram se instalando em suas margens. Hoje este núcleo de empresas constitui uma das principais aglomerações industriais do Vale do Rio dos Sinos, no Rio Grande do Sul.

A água de esgoto é caracterizada por conter despejos provenientes do uso doméstico, comercial, agrícola e industrial. As diferentes características biológicas, físicas e químicas fazem dos ambientes aquáticos nichos diversificados habitados por micro-organismos distintos. O uso indiscriminado de antimicrobianos no mundo é um problema de saúde pública e precisa ser repensado. O descontrole na ingestão e a despreocupação com o descarte dos resíduos favorecem a seleção de cepas multirresistentes. Da mesma forma, os metais pesados amplamente utilizados na indústria, muitas vezes chegam ao ambiente através de efluentes industriais sem o tratamento adequado, gerando alto grau de poluição e impacto ambiental.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados de bactérias isoladas de três pontos de coleta no Rio dos Sinos; realizar a identificação bioquímica dos principais isolados multirresistentes a antimicrobianos; avaliar a qualidade da água em relação aos coliformes e bactérias heterotróficas.

## **2, Revisão bibliográfica**

### **2.1 Água**

A água é um recurso natural indispensável à sobrevivência do homem e demais seres vivos do Planeta. É um componente fundamental para os ecossistemas da natureza, solvente universal e importante para a absorção de nutrientes do solo (Paz et al., 2000). Segundo Raucchi (2001), 97% da água do planeta Terra está nos oceanos e não pode ser utilizada para irrigação, uso doméstico e dessedentação. Os 3% restantes têm, aproximadamente, um volume de 35 milhões de quilômetros cúbicos. Grande parte deste volume está sob forma de gelo na Antártida ou na Groelândia. Somente 100 mil km<sup>3</sup>, ou seja, 0,3 % do total de recursos de água doce está disponível e pode ser utilizado pelo homem. Este volume está armazenado em lagos, flui nos rios e continentes e é a principal fonte de suprimento acrescido de águas subterrâneas.

O Brasil apresenta uma situação confortável, em termos globais, quanto aos recursos hídricos, porém, possui também a tendência desvantajosa de desperdiçá-los (Moraes & Jordão, 2002). A disponibilidade hídrica per capita, determinada a partir de valores totalizados para o país, indica uma situação

satisfatória, quando comparada aos valores dos demais países segundo a Organização das Nações Unidas (ONU) (Conjuntura Agência Nacional das Águas/ANA, 2012), Sendo assim, a existência de água limpa é requisito essencial para a manutenção dos ecossistemas aquáticos e para várias atividades humanas, tais como o abastecimento doméstico, a irrigação, o uso industrial, a dessedentação de animais, a aquicultura, a pesca e o turismo (Agência Nacional das Águas/ ANA, 2012).

## **2.2 Qualidade da água**

A qualidade necessária à água distribuída para consumo é a potabilidade, ou seja, deve estar livre de qualquer contaminação, seja esta de origem microbiológica, química, física ou radioativa, não devendo, em hipótese alguma, oferecer riscos à saúde humana (CONAMA, 2011).

A Organização das Nações Unidas (ONU) afirma que o acesso ao abastecimento de água e saneamento é uma necessidade fundamental e um direito humano, sendo então vital para a dignidade e a saúde de todas as pessoas. No entanto, é sabido que à medida que as populações e as atividades econômicas crescem, muitos países atingem rapidamente condições de escassez de água ou se defrontam com limites para o desenvolvimento econômico (Moraes & Jordão, 2002).

A água utilizada pela humanidade provém de mananciais, lagos, rios e lençóis subterrâneos, correspondendo a uma pequena parte da água disponível para utilização da população. O contato do homem com essas fontes é direto e constante. Por consequência, esses são os mais poluídos com esgotos, resíduos industriais e agrotóxicos (Albuquerque, 2001). A escassez

dos recursos hídricos projetados frente ao aumento da população e a crescente poluição doméstica ou industrial determinam a necessidade de monitoramento da qualidade das águas, com a finalidade de propor medidas que auxiliem na melhoria dos mananciais hídricos superficiais e subterrâneos (Naime & Nascimento, 2009).

Segundo Moura et al.(2009), a manutenção da qualidade do ambiente é fundamental para a qualidade final da água consumida pela população. Para isto, os trabalhos preservacionistas realizados nas bacias hidrográficas devem ser contínuos e efetivos. Além disso, a integridade de um ecossistema aquático é abalada pelo comportamento humano quando a degradação do ambiente ou o nível de poluição excede a capacidade de assimilação das substâncias antropogênicas pelos organismos vivos. Nesse contexto, o conhecimento das comunidades biológicas é de fundamental importância para assegurar o gerenciamento sustentado dos recursos hídricos e seus múltiplos usos (Strieder et al., 2006)

O grande desenvolvimento industrial é um dos principais responsáveis pela contaminação de nossas águas, seja pela negligência no tratamento de seus rejeitos antes de despejá-los nos rios, seja por acidentes e descuidos cada vez mais frequentes que propiciam o lançamento de muitos poluentes nos ambientes aquáticos, contribuindo para que as águas naturais se tornem residuárias, ou seja, efluentes (Jordão et al., 1999). Por outro lado, os despejos urbanos são, evidentemente, muito variados. Estima-se que as águas residuais urbanas contenham quantidades consideráveis de matéria em suspensão, metais pesados e, em determinadas épocas, cloro procedente da dispersão de sais nas ruas. A qualidade das águas residuais é conseqüentemente, muito

variável, tendo em certas ocasiões registros de altos índices de demanda biológica de oxigênio (DBO) (Mason, 1980).

A água é um solvente versátil frequentemente usado para transportar produtos residuais para longe do local de produção e descarga. Infelizmente, muitos dos produtos residuais transportados são tóxicos, e sua presença pode degradar seriamente o ambiente do rio, lago ou riacho receptor (White & Rasmussen, 1998). Sendo assim, a gestão adequada dos recursos hídricos está se tornando uma necessidade em função do aumento das populações e da escassez de água. Para um manejo adequado, a primeira necessidade é de informação para isto, os procedimentos mais adequados são o monitoramento ambiental integrado e sequencial dos recursos para reconhecer seu estado e as causas que atuam na sua qualidade (Naime & Fagundes, 2005).

A água doce é um recurso natural finito, cuja qualidade vem piorando devido ao aumento da população e à ausência de políticas públicas voltadas para a sua preservação. Estima-se que aproximadamente doze milhões de pessoas morrem anualmente por problemas relacionados com a qualidade da água (Merten, 2002). A contaminação das águas naturais representa um dos principais riscos à saúde pública, sendo amplamente conhecida a estreita relação entre a qualidade de água e inúmeras enfermidades que acometem as populações, especialmente aquelas não atendidas por serviços de saneamento (Libânio et al., 2005). Segundo Isaac-Marquez (2004) a água de consumo humano é um dos importantes veículos de enfermidades diarreicas de natureza infecciosa, o que torna primordial a avaliação de sua qualidade microbiológica.

Indicadores microbiológicos têm sido utilizados no mundo para indicar se os corpos d'água foram contaminados com resíduos humanos, sendo

escolhidos os micro-organismos encontrados em maiores concentrações nas fezes humanas. Os típicos indicadores incluem coliformes totais e fecais ou termotolerantes (Shibata et al., 2004). São cerca de 20 espécies indicadoras, dentre as quais se encontram as bactérias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais endotérmicos e também diversos gêneros de bactérias não entéricas, como as dos gêneros *Serratia* e *Aeromonas*. Além dos coliformes totais, esse grupo de bactérias apresenta espécies atualmente chamadas de coliformes termotolerantes; um grupo capaz de fermentar a lactose com produção de gás, entre 24 e 48 horas a temperaturas entre 44,5°C a 45,5°C. Atualmente, sabe-se que o grupo dos termotolerantes inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, que indicam contaminação de origem fecal. No entanto, espécies do gênero *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, podem persistir por longos períodos e se multiplicarem em ambientes não fecais (Cardoso et al., 2000).

Embora determinado pela legislação vigente, o monitoramento das águas superficiais não é prioridade. Excluindo-se os rios principais das bacias hidrográficas, poucos são os arroios da região metropolitana de Porto Alegre monitorados quanto aos aspectos físico-químicos e microbiológicos (Naime & Nascimento, 2009).

### **2.3 Rio dos Sinos**

A Bacia hidrográfica do rio dos Sinos possui uma superfície aproximada de 3691 Km<sup>2</sup> e encontra-se situada a nordeste do Estado, entre os paralelos 29° e 30° sul englobando, total ou parcialmente, 32 municípios (Tabela 1). Essa bacia corresponde a 4,5% da bacia hidrográfica do Guaíba e 1,5% da área total

do Estado do Rio Grande do Sul. Esta área possui uma população aproximada de 1.250.000 habitantes, sendo que 90,6 % ocupam as áreas urbanas e 9,4 % estão nas áreas rurais. A bacia do rio dos Sinos é delimitada a leste pela Serra Geral, pela bacia do Caí a oeste e ao norte, e ao sul pela bacia do Gravataí e seu curso d'água principal tem uma extensão aproximada de 190 Km (FEPAM, [http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade\\_sinos/sinos.asp](http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade_sinos/sinos.asp)).

Figura 1. Mapa do Rio dos Sinos.



<http://www.comusa.rs.gov.br/index.php/meioAmbiente/pesquisa>

Diversas Unidades de Conservação possuem parte ou a totalidade de seus territórios nesta Bacia Hidrográfica, incluindo as Áreas de Proteção Ambiental Municipais de Caraá e Riozinho, a Área de Proteção Ambiental Municipal do Morro da Borussia (Osório) e a Floresta Nacional de São Francisco de Paula. Nesta Bacia Hidrográfica existem nove pontos de captação de água para abastecimento urbano, localizados em diferentes corpos hídricos.

Ao longo da bacia hidrográfica, ocorre uma alteração entre as atividades econômicas prioritárias e, assim, dos riscos ambientais aos cursos hídricos (Parecer MP/RS 2008).

O Rio dos Sinos é considerado o mais poluído da região, possuindo importante parque industrial, onde se destacam os ramos: 1) coureiro-calçadista, potenciais poluidores de cromo, nutrientes e carga orgânica; 2) petroquímico que liberam mercúrio e hidrocarbonetos; e 3) metalúrgico que liberam metais pesados e cianeto, além da grande quantidade de esgoto doméstico urbano. O setor primário baseado na agricultura patronal, agricultores familiares e pescadores artesanais (Spricigo, 2007) é pouco significativo, com exceção do curso superior do rio (Relatório Sinos, FEPAM 2010).

Tabela 1 – Municípios pertencentes à Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos.

(Fonte: IBGE)

<b>Município</b>	<b>População total (hab)</b>	<b>% Área na bacia</b>	<b>População na bacia</b>
Araricá	4.032	99	4.027
Cachoeirinha	107.564	19,17	20.620
Campo Bom	54.018	100	54.018
Canela	33.625	59	17.071
Canoas	306.093	55,94	171.217
Capela de Santana	10.032	1,42	53
Caraá	6.403	99,67	6.383
Dois Irmãos	22.435	8,92	15
Estância Velha	35.132	93,53	35.083
Esteio	80.048	100	80.048
Glorinha	5.684	0,10	5

Gramado	28.593	31,61	7.496
Gravataí	232.629	16	3.277
Igrejinha	26.767	93,17	26.683
Ivoti	15.318	6,28	96
Nova Hartz	15.071	98,04	15.028
Nova Santa Rita	15.750	41,94	13.311
Novo Hamburgo	236.193	100,00	236.193
Osório	36.131	5,01	274
Parobé	44.776	100,00	44.776
Portão	24.657	85,99	23.979
Riozinho	4.071	99,13	4.058
Rolante	17.851	100	17.851
Santa Maria do Herval	5.891	2,60	45
Santo Antônio da Patrulha	37.035	32,58	4.416
São Francisco de Paula	19.725	11,43	6.987
São Leopoldo	193.547	100	193.547
São Sebastião do Caí	19.700	3,57	134
Sapiranga	69.189	58,95	67.792
Sapucaia do Sul	122.751	100	122.751
Taquara	52.825	93,26	52.171
Três Coroas	19.430	94,16	19.292
<b>TOTAIS</b>	<b>1.902.966</b>		<b>1.247.714</b>

Em 2006, um crime ambiental que causou a morte de mais de um milhão de peixes foi notícia internacional por ser considerada a maior tragédia ambiental no Rio Grande do Sul dos últimos 40 anos. Cerca de 42 toneladas de peixes mortos, com exemplares de 12 espécies foram retiradas do rio do Sinos. (<http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u126977.shtml>). Tamanha mortandade chamou atenção da sociedade civil e os órgãos responsáveis

foram atrás dos culpados. A Utresa, Central de Resíduos Industriais Perigosos, foi apontada como a principal responsável pelos despejos. A entidade, localizada em Estância Velha, lançava efluentes sem tratamento nos arroios que fazem parte do Rio dos Sinos. Uma ação civil pública e duas ações criminais foram movidas pelo Ministério Público Estadual. O Rio dos Sinos apresenta histórico de ocorrência de mortandades de peixes, de diversas magnitudes. Não há uma estatística precisa destas mortandades, pois estas ocorrências nem sempre são comunicadas à FEPAM. O trecho de 12 km, onde são mais frequentes as ocorrências de mortandades de peixes, está compreendido entre a foz do arroio Luiz Rau e a foz do arroio Portão. Este trecho compreende desde o município de Novo Hamburgo, passando por São Leopoldo até Sapucaia do Sul, na divisa com Portão (Relatório Sinos, FEPAM 2010). O local de maior ocorrência é junto à foz do arroio Estância Velha/Portão. O arroio Estância Velha/Portão drena os efluentes dos curtumes dos municípios de Estância Velha e Portão, além dos esgotos cloacais destes municípios. Todos os curtumes possuem sistemas de tratamento de afluentes, instalados ao final da década de 1980, por exigência da FEPAM.

## **2.4 Metais pesados**

Metais pesados são aqueles com densidades superiores a  $5\text{g/cm}^3$  (King, 1996) ou que possuem número atômico maior que 20. Nos sistemas aquáticos a introdução de metais ocorre naturalmente através de processos biogeoquímicos e intemperismo. A contribuição atribuída à atividade humana deve-se, principalmente, às atividades industriais (Yabe et al., 1998). Existem cerca de vinte metais, ou elementos atuando como estes, considerados tóxicos

para os humanos, incluindo Hg, Cd, Pb, As, Mn, Tl, Cr, Ni, Se, Te, Sb, Be, Co, Mo, Sn, W e V. Desses, os 10 primeiros são de maior utilização industrial e, por isso mesmo, os mais estudados do ponto de vista toxicológico (Tavares et al., 1992).

A poluição da biosfera com metais pesados, decorrentes de ações antrópicas, representa sérios problemas ambientais e de saúde pública em várias regiões do mundo (Passianoto et al., 2001). A atividade industrial tem contribuído muito para um aumento significativo nas concentrações de íons metálicos em águas, representando uma importante fonte de contaminação dos corpos aquáticos, principalmente quando consideramos que tais íons podem ser disseminados via cadeia alimentar (Jimenez et al., 2004).

Metais pesados em excesso podem causar diferentes doenças e sérios problemas fisiológicos, já que podem ser acumulados no corpo humano. Os resíduos contendo cádmio, cromo, manganês e níquel possuem alto poder de contaminação e, com facilidade, atingem os lençóis freáticos ou mesmo reservatórios e rios, que são as fontes de abastecimento de água das cidades. A maioria deles possui a capacidade de se acumular no ambiente e ser transportado via teia alimentar para diversos níveis tróficos da cadeia alimentar (Naime & Nascimento, 2009).

Alguns metais pesados como o cromo, o cobre e o zinco, encontrados na natureza em solos, ar e água, além dos alimentos, são considerados como sendo microelementos essenciais ao metabolismo dos organismos vivos. Entretanto, o excesso ou carência desses elementos pode levar a distúrbios no organismo, e em casos extremos, até a morte (Virga, et al., 2007).

O cromo, como é de amplo conhecimento público, está presente na indústria curtumeira, como principal curtente mineral. O cromo é metal encontrado na natureza em diversas formas, porém nunca em estado livre, e segundo Faria & Morandi (2002) existe no meio aquático em dois estados de oxidação, trivalente com baixa toxicidade e hexavalente altamente tóxico (Nascimento & Naime, 2009).

O Rio Grande do Sul em consequência de sua atividade pecuária expressiva tem na indústria curtumeira um segmento de grande importância econômica, pois é responsável por 34,3% do processamento nacional (<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-do-boi/industria-gaucha-preve-maior-exportacao-de-couro-3308/> consulta 1.06.2013), escoando sua produção por todo Brasil e também agregando valores através da exportação de manufaturados. No entanto o curtimento de peles gera grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos (Passianoto, 2001), sendo que o processamento do couro cru até o acabamento utiliza sais de cromo ou tanino como materiais curtentes, gerando, em média, 15 kg de resíduos por pele (Castilhos et al., 2002).

O níquel é metal característico da indústria metalúrgica, onde em razão das suas características físicas e de qualidade, está presente na manufatura de aço inoxidável e em outras ligas metálicas com metais não ferrosos. O níquel é também usado em recobrimentos metálicos em galvanoplastia. Também é metal constituinte de pilhas e baterias, além de ser usado como catalisador na indústria química, farmacêutica e de alimentos (Faria & Morandi 2002; Corbiet al., 2006).

O cobre tem vários usos, como na fabricação de tubos, válvulas, acessórios para banheiro e está presente em ligas e revestimentos. As fontes de cobre para o meio ambiente incluem minas de cobre ou de outros metais, corrosão de tubulações de latão por águas ácidas, efluentes de estações de tratamento de esgotos, uso de compostos de cobre como algicidas aquáticos, escoamento superficial e contaminação da água subterrânea a partir do uso agrícola do cobre e precipitação atmosférica de fontes industriais. O cobre ocorre naturalmente em todas as plantas e animais e é um nutriente essencial em baixas doses. Estudos indicam que uma concentração de 20 mg/L de cobre ou um teor total de 100 mg/L por dia na água é capaz de produzir intoxicações no homem, com lesões no fígado. Doses acima de 1,0 mg/L são letais para micro-organismos. O padrão de potabilidade para o cobre, de acordo com a Portaria 518/04, é de 2 mg/L. (CETESB, 2009).

## **2.5 Resistência a metais pesados e antimicrobianos**

O conhecimento do fenômeno da resistência a agentes físicos e químicos entre os micro-organismos data do início da era microbiana. Com a introdução das primeiras substâncias químicas com finalidade quimioterápica específica, Ehrlich e seus colaboradores Franke e Roeh, em 1905, descobriram o fenômeno da resistência às drogas. O advento do uso clínico de sulfonamidas, em 1933, e, posteriormente, da penicilina, em 1941, levou à constatação de que a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos podia ser uma característica natural das espécies de bactérias ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível (Tavares, 2000).

Os primeiros antibióticos utilizados foram de origem natural, por exemplo, penicilinas produzidas por fungos no gênero *Penicillium*, ou estreptomicinas de bactérias do gênero *Streptomyces*. Atualmente, os antibióticos são obtidos por síntese química, tais como os medicamentos de sulfa (ex. sulfamethoxazole), ou por modificação química de compostos de origem natural (Kummerer, 2009a).

Pelo menos 17 classes diferentes de antimicrobianos são conhecidos hoje. Infelizmente, para cada uma dessas classes, pelo menos um mecanismo de resistência (e muitas vezes mais de um) tem-se desenvolvido ao longo dos anos. De fato, em alguns casos, estas bactérias têm sido capazes de desenvolver resistência simultânea a duas ou mais classes de antimicrobianos, tornando o tratamento de infecções causadas por estes micro-organismos extremamente difícil, muito dispendioso e, em muitos casos associados com alta morbidade e mortalidade (Alanis, 2005).

São conhecidas três formas principais de resistência aos antimicrobianos: 1) Destruição ou transformação do antimicrobiano: ocorre quando a bactéria produz uma ou mais enzimas que degradam ou modificam o antimicrobiano, tornando-o inativo contra os micro-organismos; 2) Bombas de efluxo: é relevante para antimicrobianos que atuam no interior da bactéria, o micro-organismo é capaz de desenvolver um mecanismo de transporte ativo que bombeia as moléculas antibióticas para o exterior até atingir a concentração incapaz de prejudicá-lo; 3) Modificação do receptor: o alvo intracelular ou receptor da droga é alterado pelo micro-organismo, levando a impossibilidade da ligação receptor + droga e consequente ineficácia do antimicrobiano (Alanis, 2005; Kaye et al., 2004).

A resistência aos antimicrobianos pode ser natural (intrínseca) ou adquirida e pode ser transmitida horizontalmente ou verticalmente. Para a maioria, no entanto, a pressão seletiva exercida pela presença da droga antimicrobiana é um estímulo potente para induzir uma resposta de adaptação e é a causa mais comum de resistência bacteriana a antimicrobianos (Kümmerer, 2009b ; Oliveira, 2008). A genética de populações mostra que, mantidas as demais condições, quanto mais forte a força da seleção, mais rápida é a propagação de um alelo. Para o uso de drogas, a força da seleção é determinada pelo número de pessoas estão sendo tratadas e, entre as pessoas tratadas, o regime de tratamento. Quanto mais agressivo o regime, maior será a pressão de seleção, em favor da resistência. A força química confere vantagem seletiva ao patógeno capaz de resistir a ela conferindo a esse, a capacidade de disseminar resistência a população (Read et al.,2011).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no micro-organismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. Essa pode ser originada em mutações que ocorrem no micro-organismo durante seu processo reprodutivo e resultam de erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético. A outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível. Esta resistência faz-se através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em plasmídios, transposons e integrons (Cunha, 1998;Tavares, 2000).

Há evidência de correlação entre tolerância a metais pesados e resistência a antimicrobianos. Genes que conferem resistência a

antimicrobianos e metais pesados, na maioria das vezes, estão localizados no mesmo plasmídeo. Quando metais pesados estão presentes no ambiente como poluentes, muitos micro-organismos desenvolvem mecanismos de resistência aos metais. Como as vias de resistência são iguais ou semelhantes, os micro-organismos tornam-se resistentes também aos antimicrobianos mesmo na ausência dos desses (Chattopadhyay, 2011).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **3.1 Pontos de coleta das amostras**

As coletas das amostras foram realizadas seguindo um dos braços do Rio dos Sinos com início no município de Três Coroas. Localizado no Vale do Paranhana, a uma latitude de 29°31'01" sul e a uma longitude 50°46'40" oeste, a uma altitude média de 56 metros. O segundo município escolhido para as coletas foi Novo Hamburgo, localizado na latitude 29°40'42" sul e 51°07'50" longitude oeste, a uma altitude média de 57 metros, banhado pelo Rio dos Sinos. O terceiro ponto de coleta foi o município de Esteio, localizado na latitude 29°50'10" sul e 51°09'15" longitude oeste com altitude de 29 metros acima do nível do mar.

#### **3.2 Coletas das amostras**

As amostras foram coletadas nas estações de tratamento de água dos respectivos municípios, diretamente das tubulações de água bruta captada do Rio dos Sinos. 400 mL de água foram armazenados em frascos estéreis de 500 mL e acondicionados em caixas térmicas com gelo até o momento de

processamento dos mesmos. Foram realizadas quatro coletas sazonais (uma por estação do ano), sendo a primeira realizada no inverno (setembro de 2011), seguida da coleta na primavera (dezembro de 2011), verão (março de 2012) e a última realizada no outono (abril de 2012).

### **3.3 Semeadura e isolamento bacteriano**

Com as amostras de água bruta foram realizadas diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  e 100µL de cada diluição foi semeada em placas pelo método de espalhamento em superfície (Antunes, 1995). Todas as diluições foram plaqueadas em meios de cultura não seletivos: ágar triptona de soja (TSA), ágar R-2A e ágar padrão para contagem (PCA); e seletivos: ágar eosina azul de metileno (EMB) e ágar cetrimide. As placas foram incubadas a 30°C por 24-48 horas. Todas as semeaduras foram realizadas em triplicata.

A seleção das unidades formadoras de colônia (UFC) foi baseada no método dos quadrantes onde é realizado um mapa na placa de Petri com quatro quadrados vazados de 1cm<sup>2</sup> (Oliveira et al., 2006). As colônias selecionadas foram isoladas e purificadas através de esgotamento em placa, no mesmo meio de cultura de origem, por no mínimo duas passagens. Depois de esgotadas, as colônias foram submetidas à coloração de Gram, para confirmação da pureza e classificação das mesmas em Gram positivas ou Gram negativas. Os isolados foram crescidos em caldo triptona de soja (TSB) a 37°C por 18h e armazenados em glicerol 20%, na temperatura de -20°C.

### **3.4 Quantificação de bactérias heterotróficas**

Para determinar o número de bactérias heterotróficas, as UFC crescidas nas placas com meio PCA foram contadas. Somente foram utilizadas as diluições que apresentavam entre 30 e 300 UFC.

### **3.5 Colimetria– Método de Fermentação em Tubos Múltiplos**

O teste colimétrico foi realizado pela técnica de fermentação em tubos múltiplos, com seriação de cinco tubos, permitindo assim, a determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes – com padronização para *Escherichia coli*.

### **3.6 Análises físico-químicas**

As análises físico-químicas foram realizadas com as amostras da primeira coleta (inverno) e última coleta (outono). As amostras da coleta do inverno foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Ambientais Toxilab, onde foram avaliadas a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), a demanda química de oxigênio (DQO) e a concentração dos metais cromo, cobre e chumbo. Os mesmos parâmetros foram utilizados para a última coleta, porém as amostras foram analisadas pelo Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde não houve variação na metodologia utilizada, conforme laudos em anexo.

### **3.7 Teste de resistência a antimicrobianos**

Os antibiogramas foram realizados seguindo as normas do *Clinical and Laboratory Standart Institute* (CLSI, 2009), utilizando o método de

difusão em disco-Kirby-Bauer. Durante a realização dos testes, os isolados foram inoculados em TSB e incubados a 37°C por 24 horas respeitando a turbidez da escala 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Suabes estéreis foram embebidos nas culturas, retirando-se o excesso de líquido e semeando em placas contendo ágar Müller Hinton. Os discos de antimicrobianos foram depositados de forma equidistante sobre a superfície do meio inoculado. Foram utilizados 13 antimicrobianos de 8 diferentes classes:

- cefalotina (CFL 30µg), cefoxitina (CFO 30µg) e ceftriaxona (CRO 30µg); cefalosporinas.
- vancomicina (VAN 30µg); glicopeptídeo.
- estreptomicina (EST 10µg) e gentamicina (GEN 10µg); aminoglicosídeos.
- sulfazotrim - sulfametoxazol + trimetoprim (SUT 25µg), ciprofloxacina (CIP 5µg) e norfloxacina (NOR 10µg); fluorquinolonas.
- imipenem (IMP 10µg); carbapenêmicos.
- tetraciclina (TET 30µg).
- cloranfenicol (CLO 30µg).
- nitrofurantóina (NIT 300µg).

As placas foram incubadas a 37°C por 18 - 24 horas e, após esse período, os halos de inibição foram medidos. A interpretação das zonas de inibição foi realizada de acordo com a tabela de valores de resistência e antibiogramas da CLSI/ 2009.

### **3.8 Teste de concentração inibitória mínima para metais pesados (MIC).**

Os testes de concentração inibitória mínima de metais pesados (CIM) foram conduzidos utilizando-se a técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços, segundo Giovanella et al. (2010), com modificações. Os isolados foram incubados em caldo TSB a 37°C por 24h, estabelecendo-se o parâmetro de turbidez da escala 0,5 de McFarland. Em cada poço foi adicionado 97,5% de caldo TSB (195µL) com diferentes concentrações de soluções dos sais metálicos e 2,5% da cultura (5µL). As concentrações metálicas foram preparadas a partir de soluções-estoque prontamente diluídas em água Milli Q estéril. Os sais metálicos utilizados foram dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), com concentrações de 0,5 a 3,5 g/L, sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4.5H_2O$ ), de 0,5 a 3,5 g/L e dicloreto de níquel heptahidratado ( $NiCl_2.7H_2O$ ) com concentrações salinas no intervalo de 0,5 a 3,5 g/L. Esses metais foram escolhidos, pois já haviam sido encontrados em estudos prévios realizados pela Fundação Estadual de Proteção ao Meio Ambiente (FEPAM).

Os experimentos foram conduzidos em triplicata, sendo preparados poços com concentrado salino e com inóculo (teste); meio sem concentrado salino e com inóculo (controle positivo de crescimento do inóculo); meio sem concentrado salino e sem inóculo (controle negativo de crescimento do inóculo) e meio com concentrado salino e sem inóculo (controle negativo). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente uma alíquota de 20 µL de cada poço com concentrado salino e cultura, porém sem turbidez, foram inoculadas em placas de TSA e incubadas a 37°C por 24h. A concentração

salina da qual não se obteve crescimento em placa foi considerada a concentração inibitória mínima biocida.

### **3.9 Identificação dos micro-organismos**

Os micro-organismos isolados nas águas do rio dos Sinos foram identificados por testes bioquímicos de acordo com Mac Faddin (2000). O critério para seleção das bactérias a serem identificadas foi as que apresentaram os maiores índices de resistência, quanto ao número de classes de antimicrobianos.

Os principais testes bioquímicos empregados foram: crescimento em ágar Mac Conkey, OF, catalase, citocromo oxidase, SIM (produção de H<sub>2</sub>S, indol e motilidade), vermelho de metila, Voges Proskauer, ágar tríplice açúcar e ferro, citrato, urease, redução de nitrato, fermentação e oxidação de glicose e lactose e hidrólise da esculina entre outros.

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1 Teste colimétrico – Fermentação em tubos múltiplos.**

As amostras de água do Rio dos Sinos foram coletadas nas quatro estações do ano e, em todas as coletas, os três pontos coletados foram submetidos à análise. No ensaio da colimetria foi possível observar um aumento do número de coliformes totais e termotolerantes à medida que os pontos se distanciavam da nascente do rio. Os coliformes termotolerantes são indicadores de contaminação microbiológica e a possibilidade de ocorrência de patógenos associados às doenças de veiculação hídrica, o que limita a utilização dessas águas para vários usos, como a recreação de contato primário (Agência Nacional das Águas/ANA, 2012).

Conforme observamos na tabela 2, o município de Três Coroas possui em todas as coletas os menores valores para coliformes totais e termotolerantes. O número mais provável para coliformes totais na coleta realizada no inverno foi de  $1,1 \times 10^4$  NMP/100mL e a contagem da coleta da primavera com valores de  $1,5 \times 10^3$  NMP/100mL para os coliformes termotolerantes. Segundo as diretrizes da resolução 430/2011 do CONAMA suas águas estão classificadas como classe 2 que são águas destinadas: a) ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional; b) à proteção das comunidades aquáticas; c) à recreação de contato primário (esqui aquático, natação e mergulho); d) à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas; e) à

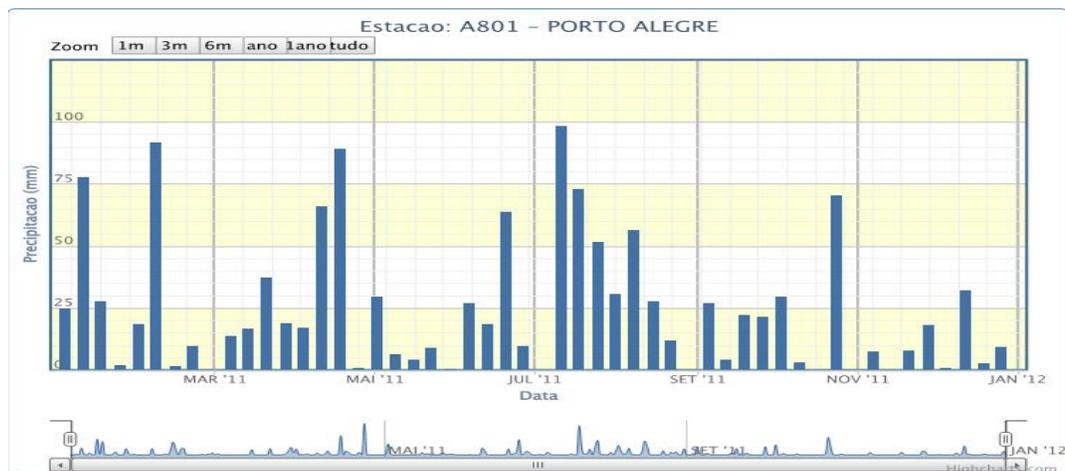
criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana. Apenas na coleta do verão os valores foram mais altos, com  $1,5 \times 10^4$  NMP/100mL de coliformes termotolerantes para a água bruta sendo definida então como classe 3.

As amostras avaliadas do município de Novo Hamburgo foram classificadas como classe 3 que são águas destinadas: a) ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional; b) à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; c) à dessedentação de animais. No entanto na coleta do verão a concentração de coliformes termotolerantes foi de  $5 \times 10^4$  NMP/100mL excedendo o limite para essa classe.

As amostras coletadas no município de Esteio apresentaram em todas as coletas os maiores valores para coliformes totais e termotolerantes, destacando-se as coletas de verão e outono com número mais provável de  $5 \times 10^4$  NMP/100mL o que enquadraria a água no município (para esse critério) na classe 4- águas destinadas: a) à navegação; b) à harmonia paisagística; c) aos usos menos exigentes. Esse resultado caracterizaria grande poluição do local onde, provavelmente, estaria acontecendo despejo de esgoto doméstico e industrial sem o tratamento adequado. Oliveira et al. (2012) quando avaliaram o número de coliformes do arroio Dilúvio, em Porto Alegre/RS constataram que em áreas com maior impacto antrópico, os índices de coliformes totais e termotolerantes tenderam a ser maiores.

No ano de 2011 os índices pluviométricos variaram conforme a figura 1. A primeira coleta foi realizada depois de um período bastante chuvoso e apresentou valores de colimetria mais baixos, conforme tabela 2.

Figura 2. Índices pluviométricos no município de Porto Alegre no ano de 2011. Fonte: [http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf) consulta em 21.02.13



Moura (2009) ao avaliar as águas do rio Cascavel/PR observou valores de NMP maiores depois de períodos chuvosos pois os micro-organismos presentes no entorno dos mananciais seriam carregados para dentro destes, ocorrendo uma possível contaminação de forma mais intensa. Cunha et al. (2003) ao avaliar mananciais no município de Macapá/AP obtiveram resultados semelhantes aos de Moura. Segundo Pinto (2010) as contagens de *Escherichia coli* nas águas do litoral santista/SP aumentavam nas coletas da água do mar e reduziam na areia depois de períodos chuvosos, inferindo que esses micro-organismos seriam carregados pela chuva. Nossos resultados divergem dos encontrados na literatura, pois no período chuvoso observamos os menores valores para colimetria, conforme tabela 2.

Tabela 2. Número mais provável (NMP) de coliformes totais, termotolerantes por 100mL de amostras de água dos diferentes pontos de coleta no rio dos Sinos.

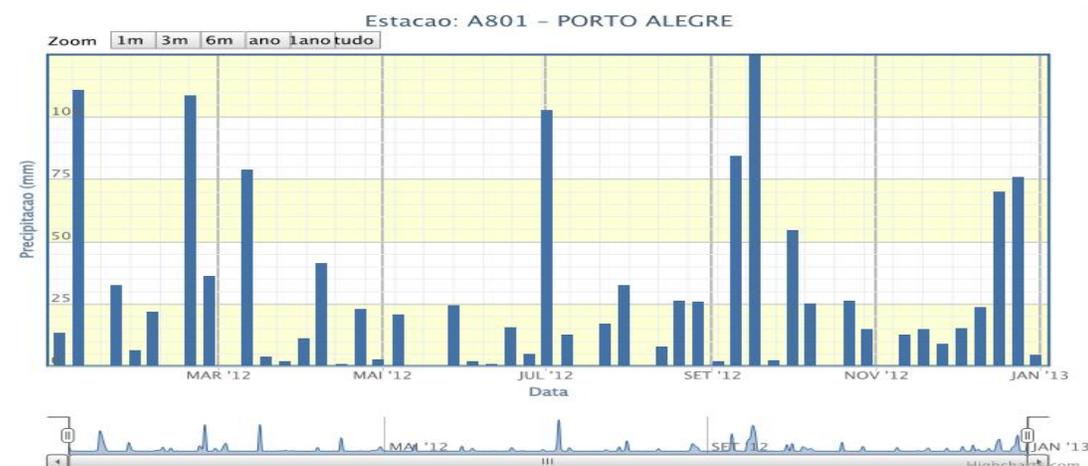
<b>Coleta</b>	<b>Pontos</b>	<b>Coliformes totais</b>	<b>Coliformes termotolerantes</b>
1	Três Coroas	$1,1 \times 10^4$	$7 \times 10^3$
1	Novo Hamburgo	$3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
1	Esteio	$4,9 \times 10^4$	$3 \times 10^4$
2	Três Coroas	$4,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$
2	Novo Hamburgo	$\geq 1,1 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$
2	Esteio	$\geq 1,1 \times 10^4$	$\geq 1,1 \times 10^4$
3	Três Coroas	$1,75 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
3	Novo Hamburgo	$9 \times 10^4$	$5 \times 10^4$
3	Esteio	$9 \times 10^4$	$5 \times 10^4$
4	Três Coroas	$1,7 \times 10^4$	$7 \times 10^3$
4	Novo Hamburgo	$4,9 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
4	Esteio	$1,1 \times 10^5$	$5 \times 10^4$

Coleta 1-inverno (set 2011); coleta 2- primavera (dez 2011); coleta 3- verão (mar 2012); coleta 4- outono (abr 2012).

No verão e outono de 2012, os índices de precipitação foram menores (Figura 2) e as temperaturas mais elevadas do verão provavelmente favoreceram o crescimento dos micro-organismos. Victorette (2010) avaliou o número de coliformes totais e termotolerantes no rio Ratonos em Florianópolis/SC e constatou um aumento no número desses no verão quando comparados à coleta da primavera. Naime & Nascimento (2009) avaliaram os números de coliformes no rio dos Sinos e observaram um aumento desses no

verão e outono de 2007 o que corrobora os resultados obtidos no presente trabalho.

Figura 3. Índices pluviométricos no município de Porto Alegre no ano de 2012. Fonte: [http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf) consulta em 21.02.13



Na tabela 2, é possível observar que na segunda coleta (primavera), nos pontos de Novo Hamburgo e Esteio as diluições das amostras não foram suficientes, extrapolando as quantidades padrão. Portanto, o número mais provável de coliformes totais e fecais, ficou subestimado sendo os valores superiores a  $1,1 \times 10^4$  NMP/100mL.

Conforme esperado, houve um aumento no número de coliformes totais e termotolerantes ao longo do curso do rio, conforme a tabela 2. Nas cidades de Novo Hamburgo e Esteio, o grau de impacto ambiental é maior e o rio recebe uma maior quantidade de efluentes domésticos e industriais. Segundo Naime & Nascimento (2009), para o parâmetro de coliformes fecais, *Escherichia coli*, as águas do arroio Pampa (importante afluente do rio dos Sinos) apresentaram resultados semelhantes ao esgoto local, corroborando

todas as indicações de que a contribuição antrópica é um dos fatores fundamentais na influência sobre a qualidade de água do arroio monitorado.

#### **4.2 Determinação do número de bactérias heterotróficas**

Na contagem de bactérias heterotróficas, foi observado um aumento no número de unidades formadoras de colônia (UFC) conforme nos afastamos da nascente. Na tabela 3 é possível observar que o município de Três Coroas apresenta os menores valores de bactérias heterotróficas, quando comparado a Novo Hamburgo e Esteio. Oliveira et al. (2012) ao avaliarem esse parâmetro no Arroio Dilúvio em Porto Alegre/RS descreveram padrão similar, relatando que quanto mais afastado da nascente, e com conseqüente ação antrópica maior, maiores eram as contagens de bactérias heterotróficas.

A contagem de bactérias heterotróficas, genericamente definidas como micro-organismos que requerem carbono orgânico como fonte de nutrientes, fornece informações sobre a qualidade bacteriológica da água de uma forma mais ampla. O teste inclui a detecção inespecífica de bactérias, sejam de origem fecal, componentes da microbiota natural da água ou resultantes da formação de biofilmes no sistema de distribuição. Servem, portanto, de indicador auxiliar da qualidade da água (BRASIL, 2006; Domingos et al., 2007).

Tabela 3. Contagem de bactérias heterotróficas (UFC/ 100mL) no diferentes pontos do Rio dos Sinos

Pontos	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Três Coroas	$3,08 \times 10^4$	$3,83 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$
Novo Hamburgo	$3,88 \times 10^4$	$1,21 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$1,01 \times 10^5$
Esteio	$6,83 \times 10^4$	$1,45 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	$1,31 \times 10^5$

Coleta 1-inverno (set 2011); coleta 2- primavera (dez 2011); coleta 3- verão (mar 2012); coleta 4- outono (abr 2012).

Conforme a tabela 3, é possível observar que a coleta realizada no verão apresentou as maiores contagens em todos os pontos. Resultado esperado, pois as temperaturas mais altas favorecem o crescimento dos micro-organismos.

#### 4.3 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos avaliados na primeira e na última coleta encontram-se dispostos na tabela 4, na qual verificamos que não foi possível avaliar a concentração de metais pesados na primeira coleta. Podemos levantar duas hipóteses principais: i) devido ao grande volume de chuvas em dias anteriores à coleta, os metais pesados avaliados estariam muito diluídos, impossibilitando a quantificação dos mesmos; ii) ou que a técnica utilizada para avaliação não foi adequada, pois não era suficientemente sensível, considerando que a concentração pudesse ser baixa.

Tabela 4. Análises físico-químicas das águas do rio dos Sinos referentes à primeira (inverno) e quarta coleta (outono).

<b>COLETA 1</b>	<b>Três Coroas</b>	<b>Novo Hamburgo</b>	<b>Esteio</b>
DBO mg O <sub>2</sub> /L	4,45	5,25	5,65
DQO mg O <sub>2</sub> /L	14,6	17,5	18,9
Cromo	<0,01 mg/L	<0,01 mg/L	<0,01 mg/L
Níquel	<0,02 mg/L	<0,02 mg/L	<0,02 mg/L
Chumbo	<0,026 mg/L	<0,026 mg/L	<0,026 mg/L
<b>COLETA 4</b>	<b>Três Coroas</b>	<b>Novo Hamburgo</b>	<b>Esteio</b>
DBO mg O <sub>2</sub> /L	5	5,8	2,5
DQO mg O <sub>2</sub> /L	10,4	14	17,6
Cromo	1,34 µg/L	2,29 µg/L	3,96 µg/L
Níquel	ND	3,15 µg/L	2,25 µg/L
Chumbo	1,38 µg/L	1,13 µg/L	1,37 µg/L

Na tabela 4, pode-se observar que nos três pontos, da última coleta, a concentração de cromo encontra-se dentro dos os limites estabelecidos pelo CONAMA/430 de 2011 que permitem até 0,5 mg/L de cromo total. Segundo Naime & Fagundes (2005) a pluviosidade auxilia na diluição deste metal pesado. Porém, é possível observar que a concentração do metal é crescente ao longo do curso do rio. Oliveira, et al. (2012) ao avaliarem a concentração de cromo hexavalente nas águas do Rio dos Sinos no município de Novo Hamburgo, observaram valores dentro do limite permitido na coleta realizada no verão e superiores ao permitido na coleta realizada no outono. Naime &

Nascimento (2009) analisando as águas do arroio Pampa/Novo Hamburgo observaram uma concentração de cobre de 80 vezes maior ao valor máximo permitido segundo a resolução CONAMA/430. Para Naime & Fagundes (2005) os valores de cobre indicam a influência dos curtumes, da vizinha cidade de Estância Velha, na qualidade da água do Arroio Portão/Novo Hamburgo.

Os valores do metal chumbo, em todas as localidades e coletas, encontravam-se dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA/430 (2011) com valores máximo permitidos de 0,03 mg/L. Naime & Nascimento (2009) relatam que o chumbo foi o metal que apresentou o melhor resultado, ou seja, foi encontrado em apenas uma das nove coletas do período monitorado. Oliveira, et al. (2012) relatam que, no arroio Dilúvio em Porto Alegre/ RS, a concentração de chumbo está dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente.

Ao avaliarmos as concentrações do metal níquel, observa-se que as mesmas estão dentro dos limites determinados pelo COMANA/430 (2011) que permite a concentração máxima de 0,025 mg/L. No município de Três Coroas, nas duas análises realizadas, o metal não foi encontrado. O valor mais alto encontrado foi no ponto do município de Novo Hamburgo, mas ainda assim dentro dos padrões estabelecidos. Nas análises de Naime & Nascimento (2009) o parâmetro níquel seria o único que, nas águas do Arroio Pampa, causaria impacto na qualidade da água bruta do município de Novo Hamburgo. O ponto no município de Esteio apresentou, para o parâmetro níquel, índices aceitáveis conforme a legislação do CONAMA/430 (2011) da mesma forma no relatório divulgado pela FEPAM no ano de 2009 para o município de Esteio.

Para demanda bioquímica de oxigênio (DBO), os resultados obtidos mostram valores similares quando comparamos as duas coletas nos períodos de inverno e outono. A DBO de uma água é a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica por decomposição microbiana aeróbia para uma forma inorgânica estável. A DBO é considerada como a quantidade de oxigênio consumido durante um determinado período de tempo, numa temperatura de incubação específica (Cetesb, 2009).

Os resultados para o parâmetro DBO (segundo a resolução do CONAMA n°20/86) na amostra de água de Três Coroas, na primeira coleta seria de qualidade boa, sendo classificada como Classe 2. Segundo relatório da FEPAM (2011), o trecho superior do Rio dos Sinos apresenta água de qualidade superior aos trechos médio e inferior, que estão expostos a um maior impacto ambiental.

No entanto, ao observarmos os dados presentes na tabela 4, o ponto de Esteio, na quarta coleta, apresentou o melhor valor para DBO, quando comparado a todos os pontos e coletas, com concentrações de 2,5 mg O<sub>2</sub> /L enquadrando-se no padrão de Classe 1. Tal resultado é bastante contraditório e diferente do esperado para as águas do município de Esteio. Apesar de Strieder et al. (2006) terem observado DBO de Classe 1 no trecho inferior do Rio dos Sinos em Novo Hamburgo e Naime & Fagundes (2005) afirmarem que os valores de concentração de matéria orgânica (DBO) são variáveis em função da vazão dos cursos d'água, nossos resultados (Tabelas 2, 3 e 4) apontam para uma água de qualidade ruim, enquadrando-se na Classe 3 dos parâmetros do CONAMA 430/2011. Corroborando nossos estudos, o relatório da FEPAM de 2011 afirma que ao entrar nas regiões metropolitanas as

concentrações de matéria orgânica aumentam, resultando em água de pior qualidade.

Na coleta de outono, o DBO de Três Coroas foi de 5 mg O<sub>2</sub> /L, este resultado pode ser devido à diminuição das chuvas no verão e no início do outono o que aumentaria a concentração de matéria orgânica nas águas do município. Nas duas coletas realizadas em Novo Hamburgo e na primeira coleta realizada em Esteio, os valores de DBO foram similares (>5 mg O<sub>2</sub> /L), com o padrão de qualidade da água de Classe 2, conforme classificação do CONAMA. Avaliando o Arroio Portão Naime & Fagundes (2005), observaram que o aumento das chuvas nos meses de inverno não é suficiente para diluir a contaminação das águas por este parâmetro. O arroio Pampa em Novo Hamburgo apresenta, em toda a sua extensão, altos níveis de poluição doméstica, muitas vezes, com valores que são comparáveis aos do esgoto doméstico bruto (Naime & Nascimento, 2009). Na avaliação do arroio Peão, também no município de Novo Hamburgo, os valores de DBO em dois pontos de coleta foram superiores a 7 mg O<sub>2</sub>/L segundo Strieder et al. (2006).

DQO é a quantidade de oxigênio necessária para oxidação da matéria orgânica de uma amostra por meio de um agente químico, como por exemplo, o dicromato de potássio. O aumento da concentração de DQO num corpo d'água deve-se principalmente a despejos de origem industrial (CETESB, 2009). Ao analisarmos os resultados por coleta, é possível observar que os valores são crescentes conforme nos afastamos da nascente. Esse resultado ratifica os dados de colimetria e contagem de heterotróficos, os quais também indicam água de pior qualidade ao longo do rio, seguindo por aumento da urbanização e ação antrópica. Para os valores de DQO segundo Oliveira et al.

(2012) ao avaliarem as águas do arroio Dilúvio em Porto Alegre/ RS, o último ponto de coleta mais afastado da nascente e que recebeu despejos ao longo do curso do arroio, foi o ponto com os maiores valores para DQO sendo que nas coletas do verão e inverno teve resultados superiores a 60 mg O<sub>2</sub> /L. Oliveira et al. (2012) observou que no verão, a DQO das amostras de São Leopoldo revelaram um perfil de poluição orgânica superior às amostras de Novo Hamburgo. No Rio Grande do Sul os limites máximos estabelecidos para DQO, de acordo com a portaria número 05/89 da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente (SSMA) estão entre  $\leq 450$  a  $\leq 160$  mg O<sub>2</sub> /L de acordo com a vazão do efluente poluidor. Sendo assim, as águas do Rio dos Sinos encontram-se dentro dos valores estabelecidos pela Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente.

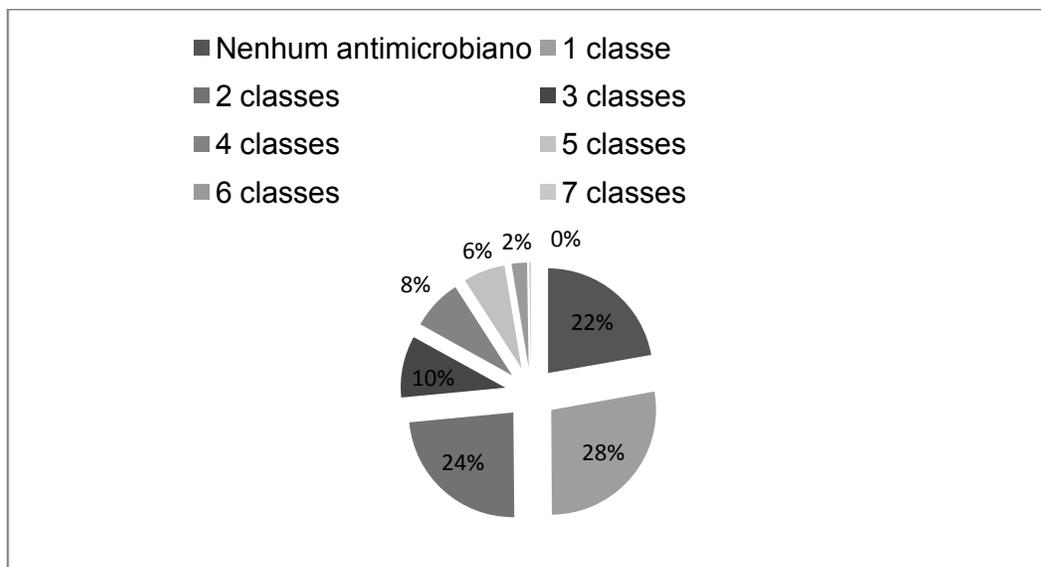
#### **4.4 Perfil de resistência a antimicrobianos**

O perfil de suscetibilidade foi determinado para as 410 bactérias isoladas dos três pontos nas quatro coletas, sendo: 59 isolados na primeira coleta, 76 isolados na segunda coleta, 141 isolados na terceira coleta e 134 isolados na terceira coleta. Os antibióticos foram selecionados por serem de uso rotineiro e apresentarem um amplo espectro de ação.

A maior parte das bactérias isoladas e submetidas à coloração de Gram foram bactérias Gram negativas (94,39%). Estas são as bactérias que mostraram o maior perfil de resistência aos antimicrobianos. De todas as bactérias testadas 77,32% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, 49,03% foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos (Figura 3). Pontes et

al. (2009), ao avaliarem água de lagos em Rio Doce/MG, observaram que 71% das bactérias Gram negativas eram multirresistentes (resistentes a duas ou mais classes). Canal (2010), ao avaliar perfil de resistência de *Escherichia coli* na Lagoa dos Patos/RS observou que 54,5% dos isolados na região de Rio Grande/RS eram multirresistentes.

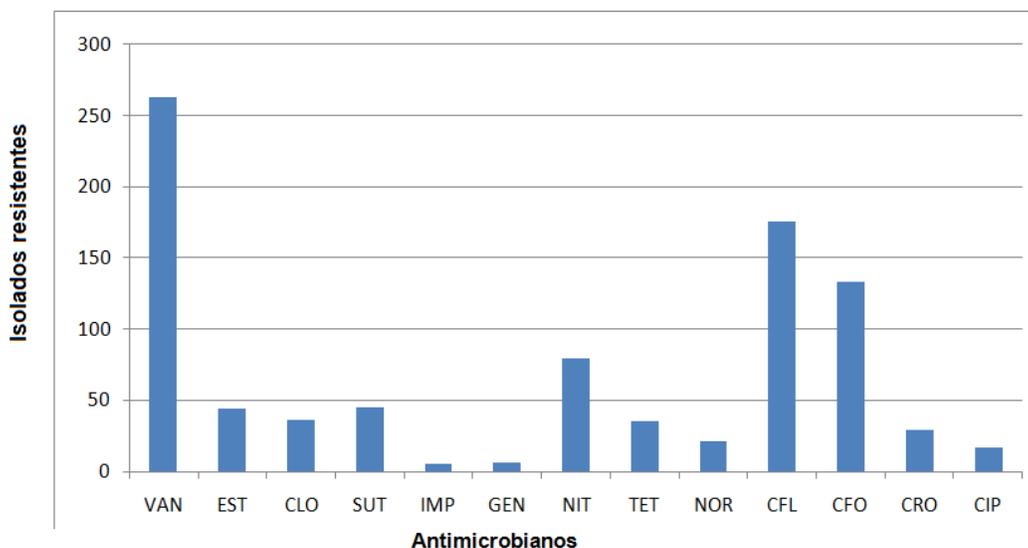
Figura 4. Freqüência de resistência e resistência múltipla a antimicrobianos de bactérias isolados do Rio dos Sinos.



O aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos pode ser considerado como uma manifestação natural regida pelo princípio evolutivo da adaptação genética de organismos às mudanças no seu meio ambiente. Como o tempo de duplicação das bactérias pode ser de apenas 20 minutos, existe a possibilidade de serem produzidas muitas gerações em apenas algumas horas, havendo, portanto, inúmeras oportunidades para uma adaptação evolutiva (Silveira et al., 2006).

A vancomicina foi o antimicrobiano cujas bactérias apresentaram maior perfil de resistência, com 64,15% dos isolados. Os perfis de resistência também foram altos para, cefalotina e cefoxitina com 42,93% e, 32,44% das bactérias resistentes, respectivamente. O perfil de resistência aos demais antimicrobianos foram mais baixos conforme mostrado na figura 4.

Figura 5. Número de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos utilizados nos ensaios de susceptibilidade.



VAN- vancomicina  
 IMP- imipenem  
 NOR- norfloxacina  
 CIP- ciprofloxacina

EST- estreptomicina  
 GEN- gentamicina  
 CFL- cefalotina

CLO- cloranfenicol  
 NIT- nitrofurantoina  
 CFO- cefoxitina

SUT- sulfazotrim  
 TET- tetraciclina  
 CRO- ceftriaxona

As altas taxas de resistência à vancomicina devem-se provavelmente ao fato da grande maioria dos isolados serem Gram negativos. Vancomicina é ativa primariamente contra cocos Gram positivos, mas não possui atividade contra bactérias Gram negativas e micobactérias (Silveira et al., 2006).

As taxas de resistência à cefalotina foram bastante altas. Os resultados mostraram que 42,93% dos isolados cresceram na presença desse antimicrobiano. Koch et al., (2008) avaliando resistência a uropatógenos observaram que 46,7% dos isolados eram resistentes à cefalotina e 22,3% apresentaram resistência à nitrofurantoína. Com índices similares, observamos que 19,27% dos micro-organismos avaliados nesse estudo tinham fenótipo de resistência a nitrofurantoína.

Heck et al. (2012) reportaram, ao avaliar isolados de leira de compostagem, um moderado perfil de resistência dos micro-organismos à cefoxitina, 34,59%. Nesse trabalho obtivemos padrão similar com 32,44% dos isolados resistentes a este antimicrobiano. Já, em estudo realizado por Oliveira, et al., (2009) os autores obtiveram 48,71% dos isolados testados resistentes a cefoxitina ao avaliarem *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp isoladas de efluente hospitalar oriundo do Hospital Universitário de Santa Maria/RS.

Das bactérias isoladas no Rio dos Sinos 10,98% mostraram-se resistentes ao antimicrobiano sulfazotrim. Henriques (2006) ao avaliar água de um estuário em Portugal, observou que 24% dos isolados apresentavam perfil de resistência a este antimicrobiano, enquanto Oliveira et al. (2012), ao analisar as águas do Arroio Dilúvio, observaram que 31,03% dos isolados testados eram resistentes a sulfazotrin.

O perfil de resistência à estreptomina foi observado em 10,73% das bactérias estudadas no presente trabalho. Resultados similares foram observados por Oliveira et al.(2012) nas águas do arroio Dilúvio onde 13,79% dos micro-organismos testados eram resistentes à estreptomina. Os genes que conferem resistência a estreptomina podem estar associados à

plasmídeos conjugativos e não conjugativos e a transposons e parecem ser constitutivos, não sendo induzidos pela presença do antimicrobiano ([http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/aminoglicosideos3.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/aminoglicosideos3.htm). Consulta em 05.05.2013).

No presente estudo 91,46% dos isolados foram sensíveis à tetraciclina. Valores similares 88,4%, foram observados por Andrade (2010) com isolados bacterianos do rio São Francisco. As tetraciclina são drogas muito utilizadas no tratamento de bactérias Gram positivas e negativas. O seu baixo custo e fácil aplicação faz com que sejam muito consumidas na medicina humana e veterinária (Chopra et al., 2001). Observamos também uma alta taxa de isolados sensíveis à ceftriaxona (92,93%). Segundo Abreu (2010), 87,2% dos micro-organismos isolados de efluente hospitalar em Maringá/PR mostraram-se sensíveis ao antimicrobiano ceftriaxona. Entretanto, Andrade (2010) observou perfil de resistência bastante diferente no Rio São Francisco, onde 84,6% dos isolados foram resistentes ao antimicrobiano.

Conforme a figura 4, é possível observar baixa resistência à norfloxacin e cloranfenicol. Hirsch et al. (2006), ao avaliarem resistência de *Aeromonas* em ambientes aquáticos, obtiveram resultados semelhantes. A resistência às quinolonas, como norfloxacin, é considerada de origem cromossômica e não devido a elementos genéticos móveis, advinda da pressão de seleção de isolados resistentes frente às drogas (Goñiurriza et al., 2000). Oliveira (2012) encontrou valores maiores, com 26,42 % de isolados resistentes ao cloranfenicol nas águas do arroio Dilúvio.

Os antimicrobianos que foram mais eficientes na inibição do crescimento das bactérias foram o imipenem (apenas cinco isolados resistentes),

gentamicina (seis isolados resistentes) e ciprofloxacina (dezessete isolados resistentes). Heck (2012), ao avaliar um perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de compostagem, obteve resultados semelhantes. Ratificando os dados, Oliveira (2012) também observou suscetibilidade similar, pois somente um isolado das águas do arroio Dilúvio em Porto Alegre/RS foi resistente ao imipenem e apenas três isolados resistentes à ciprofloxacina. Schneider et al. (2009), ao avaliarem o perfil de resistência a antimicrobianos em amostras isoladas em águas superficiais, em área perto de produção de suínos, observaram 100% das bactérias sensíveis à gentamicina. Sendo assim, eficiência dessas drogas pode estar relacionada ao uso discriminado.

Na coleta 1 (inverno) tivemos o menor percentual de micro-organismos multirresistentes. No universo de 59 isolados, 17 (29%) apresentaram resistência a duas classes ou mais. Apenas um isolado foi resistente a cinco classes de antimicrobianos. O antimicrobiano contra o qual as bactérias apresentaram maior resistência foi a vancomicina com 33,9%, seguido de cefalotina com 11,86% e para os antimicrobianos imipenem, tetraciclina, norfloxacina e ciprofloxacina apenas 1,69% dos micro-organismos testados apresentou fenótipo de resistência. Hölzel *et al.* (2010), ao estudarem o perfil de resistência em lodo de esgoto, descreveram que 100% dos isolados de *Escherichia coli* encontradas foram suscetíveis a imipenem e ciprofloxacina.

Na coleta 2 (primavera), 35 (46%) dos 76 micro-organismos isolados mostraram-se resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos. Cinco isolados apresentaram resistência a cinco ou mais classes. Vancomicina foi o antimicrobiano ao qual as bactérias mostraram-se mais resistentes (69,74%) e nenhum micro-organismos da coleta 2 foi resistente ao imipenem.

Na coleta 3 (verão) constatamos que 52,48% dos isolados eram resistentes a mais de duas classes de antimicrobianos e 7 desses mostraram-se resistentes a cinco ou mais classes. Do total de 141 micro-organismos, 104 (73,76%) isolados apresentaram perfil de resistência à vancomicina, 75 (53,19%) à cefalotina. Todos os micro-organismos isolados na terceira coleta foram sensíveis a gentamicina.

A quarta coleta (outono) foi a que apresentou maior número de bactérias multirresistentes, 81 (60,45%) foram resistentes a mais de duas classes de antimicrobianos e 21 dessas apresentaram resistência a cinco classes ou mais. A vancomicina foi, mais uma vez, o antimicrobiano cujos micro-organismos apresentaram mais resistência, ocorrendo em 86 (64,17%) dos 134 isolados. Os antimicrobianos cujos micro-organismos apresentaram maior suscetibilidade foi a gentamicina 2 (1,49%), seguida do imipenem 3 (2,24%),

Ao analisarmos os dados de todas as coletas, o ponto Esteio foram o que apresentou maior número de micro-organismos resistentes a mais de cinco classes de antimicrobianos, totalizando dezesseis isolados. Nas águas de Novo Hamburgo observamos onze isolados com essa característica e no ponto de Três Coroas sete bactérias apresentaram esse fenótipo.

#### **4.5 Identificação dos isolados resistentes a cinco ou mais classes de antimicrobianos**

Neste estudo, diferentes meios de cultura foram utilizados para o isolamento da população microbiana. Após o isolamento e coloração de Gram para verificação de pureza e morfologia das colônias, todos os 410 isolados foram submetidos ao ensaio do antibiograma. As bactérias resistentes a cinco

ou mais classes de antimicrobianos foram submetidas a provas bioquímicas para identificação. Nosso objetivo inicial era identificar os 34 isolados que apresentaram esse perfil, no entanto somente foi possível a identificação de 24 micro-organismos, pois tivemos dificuldades com o crescimento das culturas durante a identificação. Abreu (2010) relata dificuldade de crescimento de amostras ambientais isoladas de efluentes hospitalares depois de algumas passagens em meios de cultura.

Tabela 5. Perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados e identificação dos micro-organismos.

Isolados	Coleta	Ponto	Resistência aos antimicrobianos	Cr	Ni	Cr	Identificação
EmbNh3	1	NH	VAN,EST,NIT,NOR,CFL	1	3	1,5	<i>Escherichia coli</i>
Tsa38	2	TC	EST,CLO,GEN,NIT,TET,CFL	0,5	3	1,5	NI
R2a34	2	TC	EST,CLO,GEN,NIT,TET,CFL,CRO	0,5	2	1,5	NI
R2aNh3	2	NH	VAN,CLO,SUT,NIT,CFL	1,5	1,5	1,5	NI
R2aNh7	2	NH	VAN,CLO,NIT,TET,CFL	1,5	3	1,5	NI
R2aE3	2	ES	EST,SUT,NIT,NOR,CFL,CIP	2	3,5	1	<i>Enterococcus spp.</i>
Tsa33	3	TC	VAN,CLO,SUT,NIT,CFL	0,5	3,5	3,5	NI
EmbNh3	3	NH	VAN,NIT,TET,NOR,CFL	2,5	3,5	2,5	<i>Enterobacter spp</i>
CetNh3	3	NH	VAN,CLO,SUT,NIT,CFL,CFO	1	3,5	1,5	<i>Pseudomonas spp.</i>
R2aNh9	3	NH	VAN,NIT,TET,NOR,CFL,CFO	1,5	3,5	1,5	<i>Staphylococcus spp.</i>
R2aE16	3	ES	VAN,EST,CLO,SUT,NIT,NOR,CFL,CFO,CRO,CIP	0,5	2,5	2	NI
R2aE17	3	ES	VAN,CLO,SUT,NIT,NOR,CFL,CFO,CRO,CIP	1	3,5	1,5	NI
TsaE18	3	ES	VAN,CLO,SUT,NIT,CFL	2,5	2,5	2	NI
Emb33	4	TC	VAN,CLO,SUT,NIT,CFL,CFO	1,5	2,5	1,5	NI
Emb310	4	TC	VAN,CFL,CFO,GEN,TET,NIT,EST,CLO	1,5	3,5	2	<i>Escherichia coli</i>
Emb313	4	TC	VAN,CFL,CFO,NIT,TET,CLO	2,5	3,5	2,5	<i>Citrobacter spp.</i>
Emb314	4	TC	VAN,NIT,TET,EST,CFO,CFL	2,5	3,5	2	<i>Citrobacter spp.</i>
EmbNh1	4	NH	VAN,EST,CLO,SUT,CFL	0,5	2	2	<i>Serratia spp.</i>

EmbNh4	4	NH	VAN,EST,CLO,SUT,TET,NOR,CFL,CIP	0,5	2,5	2	<i>Salmonella spp.</i>
EmbNh7	4	NH	VAN,SUT,CLO,SUT,CFL	1,5	3,5	2,5	<i>Citrobacter spp.</i>
EmbNh15	4	NH	VAN,EST,CLO,SUT,TET,CFL,CFO,CIP	1	3,5	3	<i>Salmonella spp.</i>
CetNh3	4	NH	VAN,CLO,NIT,CFL,CFO,SUT	1,5	3,5	2	<i>Pseudomonas spp.</i>
CetE9	4	ES	VAN,EST,CLO,SUT,GEN,NIT,TET,NOR,CFL, CFO,CRO,CIP	1	3	1	<i>P. aeruginosa</i>
CetE7	4	ES	VAN,CLO,SUT,NIT, CFL,CFO	0,5	3,5	1,5	<i>P. aeruginosa</i>
CetE5	4	ES	VAN,CLO,SUT,NIT,CFL,CFO	0,5	3,5	1,5	<i>Pseudomonas spp.</i>
CetE4	4	ES	VAN,CLO,SUT,NIT,NOR,CFL,CFO,CRO,CIP	1,5	3,5	2	NI
CetE3	4	ES	VAN,EST,CLO,SUT,NIT,CFL,CFO	2,5	3,5	2	<i>P. aeruginosa</i>
TsaE4	4	ES	VAN,EST,CLO,SUT,NIT,CFL,CFO	1	3,5	1,5	NI
TsaE3	4	ES	VAN,EST,CLO,SUT,GEN,NIT,TET	1	1	1,5	NI
EmbE2	4	ES	VAN,EST,CLO,NIT,CFL,CIP	1,5	3,5	2	<i>Escherichia coli</i>
EmbE5	4	ES	VAN,EST,NOR,SUT,CFL,CIP	1	3,5	2	<i>Escherichia coli</i>
EmbE15	4	ES	VAN,EST,SUT,NIT,NOR,CFL,CFO	1	3,5	3	<i>Escherichia coli</i>
EmbE17	4	ES	VAN,EST,NIT,TET,CIP	0,5	3,5	2	<i>Escherichia coli</i>
EmbE18	4	ES	VAN,EST,TET,NOR,CFL,CIP	0,5	3,5	2	<i>Escherichia coli</i>

Na primeira coleta, tivemos apenas um isolado multiresistente, coletado no ponto de Novo Hamburgo, um exemplar da espécie *Escherichia coli*. Segundo (Mota, 2005) *Escherichia coli* é um micro-organismo versátil no que se refere a aceitar e transmitir genes de resistência, mesmo de micro-organismos filogeneticamente distantes, o que lhe confere uma enorme importância ecológica na dispersão destes genes.

Na segunda coleta, dos cinco isolados com fenótipo multiresistente a cinco ou mais classes de antimicrobianos, foi possível a identificação de apenas um, conforme a tabela 5. É importante ressaltar que esse isolado é sensível a vancomicina. Os cocos Gram positivos são a principal causa de

infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), sendo o gênero *Enterococcus* um dos principais responsáveis. Ao avaliar micro-organismos desse gênero no Arroio Dilúvio, em Porto Alegre/RS, Nachtigall (2011) observou que 66,09% dos isolados foram resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos.

Na terceira coleta, dos sete micro-organismos que se mostraram resistentes a mais de cinco classes, foi possível a identificação de quatro, como observado na tabela 5. *P. aeruginosa* é um dos paradigmas de patógeno com resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos. Essa resistência é causada pela produção da enzima induzível AmpC, baixa permeabilidade da sua membrana externa e vários sistemas de expulsão ativa (Martínez-Martínez, 2010). Outro gênero coletado e identificado foi o *Staphylococcus*. Segundo Guimarães (2012), as bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. são conhecidas por possuírem genes de resistência a betalactâmicos, macrolídeos, estreptomicina e tetraciclina.

Como é possível observar na tabela 5, na quarta coleta obtivemos o maior número de multirresistentes. Segundo Bertona (2005) os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* são reconhecidamente produtores de  $\beta$ -lactamases AmpC. Estas enzimas são codificadas pelo gene *amp C*, e sua produção pode ser induzida quando estes isolados clínicos são expostos a agentes  $\beta$ -lactâmicos. A hiperprodução desta enzima pode acarretar hidrólise de cefalosporinas, como ceftazidima e ceftriaxona, ocasionando falência terapêutica durante tratamento com estes agentes. As cefalosporinas de quarta geração e os carbapenêmicos são mais estáveis à hidrólise pela AmpC ([http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/op](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/op)

[as\\_web/modulo3/gramn\\_lacta5.htm](#)). O gênero *Salmonella* é um importante patógeno, pois, segundo a ANVISA, sua presença está relacionada a surtos alimentares ([http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2004/170904\\_1.htm](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2004/170904_1.htm)). O surgimento de cepas resistentes de *Salmonella* sp. é comum e este fato é agravado com a ampla utilização de antibiótico em rações animais, principalmente como promotores de crescimento na avicultura Cortez, et al., (2006). Da água bruta coletada no município de Esteio, foi possível identificar três isolados da espécie *P. aeruginosa* e um exemplar do gênero *Pseudomonas* sp.. O micro-organismo que foi resistente ao maior número de classes de antimicrobianos (sete) foi *P. aeruginosa* coletada em Esteio. A resistência intrínseca do gênero *Pseudomonas* não aparece para cefalosporina de terceira e quarta gerações, aminoglicosídeos, algumas fluorquinolonas e carbapenêmicos, entretanto este micro-organismo apresenta capacidade de desenvolver resistência a qualquer desses agentes microbianos (Feitosa, 2012; Cacci, 2007). *E. coli* foi a espécie mais frequente, com seis exemplares identificados. Vale ressaltar que essa espécie foi identificada em três das quatro coletas. Esse dado revela-se bastante importante porque *E. coli* é considerada um veículo prevalente para a disseminação de genes de resistência no ambiente aquático devido à sua abundância em tais ecossistemas (Cardonha et al.,2004).

#### **4.6 Concentração inibitória mínima (CIM) de metais pesados.**

Dentre as análises físico-químicas realizadas na primeira coleta e na quarta coleta, foi avaliada a presença de metais pesados nas águas dos municípios de Três Coroas, Novo Hamburgo e Esteio definindo suas

concentrações. Foram selecionados três metais – cromo, níquel e chumbo – para as análises. Nos testes preliminares de CIM, observamos que o chumbo decantava (provavelmente pela sua grande massa atômica) tornando-se indisponível para metabolização pelos micro-organismos, por isso foi substituído nos testes pelo cobre. As concentrações de metais estão na tabela 4.

Os resultados indicam que todos os valores encontrados nas amostras de água estão de acordo com os padrões determinados pela legislação nacional para qualidade das águas, através da resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Todos os metais testados estão enquadrados na Classe II.

Cromo (Cr) é um metal de transição considerado como importante fonte de poluição ambiental. É despejado no meio ambiente através da eliminação de resíduos de indústrias como curtumes, acabamento metalúrgico e metal, têxteis e cerâmica, pigmentos e conservantes de madeira, fabricação de sensibilizador fotográfico entre outros (Basu, 1997).

Ao observamos a figura 5, na primeira coleta constatamos que em torno de 25% dos isolados mostraram-se resistentes apenas à concentração de 176,76 mg/L de cromo, menor concentração testada. Aproximadamente 65% dos isolados foram sensíveis às concentrações intermediárias entre 353,53 mg/L, 530,28 mg/L e 707,04 mg/L. Somente 5% dos isolados apresentou resistência igual ou maior à concentração 1237,32 mg/L de cromo. Matyar, et al. (2010), ao avaliar isolados do Mar Mediterrâneo, observou que 38.3% das *Aeromonas* e 31.9% das *Pseudomonas* testadas no estudo foram resistentes a concentrações >3,200 mg/L de cromo.

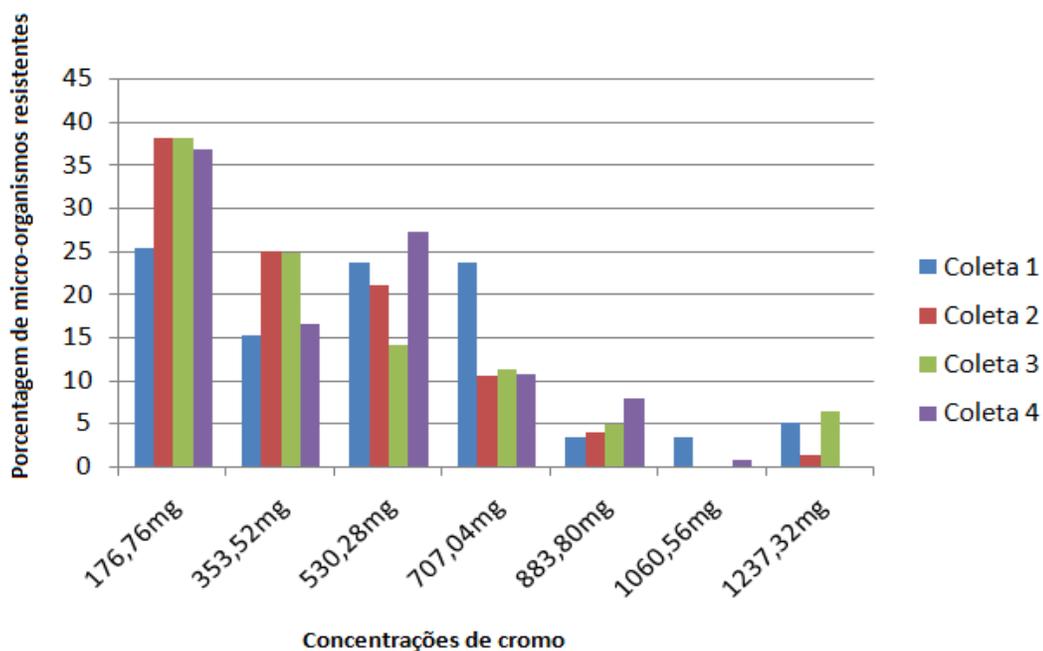
Na segunda coleta mais de 35% dos das bactérias foram resistentes à 176,76 mg/L de cromo. Mais de 25% dos isolados apresentou sensibilidade a 353,53 mg/L e cerca de 21% dos micro-organismos foi capaz de crescer em concentrações de 530,28 mg/L do metal, 10% foi resistente a 707,04 mg/L de cromo, enquanto 5% apresentou crescimento mas concentrações superiores entre 883,80 mg/L e 1237,32 mg/L de cromo. Shakoori & Muneer, (2002) testaram seis bactérias isoladas de águas residuais de efluentes industriais no Paquistão. Todas apresentaram resistência a concentrações de cromo hexavalente que variaram de 280 até 400 mg/L.

Na terceira coleta mais de 35% dos isolados mostraram-se resistentes somente a menor concentração (176,76 mg/L de cromo), 25% a 353,53 mg/L de cromo e quase 15% a concentração de 530,28 mg/L. Em torno de 10% dos isolados 176,76 mg/L de cromo apresentou sensibilidade a 707,04 mg/L do metal. Cerca de 5% dos micro-organismos apresentaram sensibilidade as concentrações de 883,80 mg/L e 1237,32 mg/L de cromo. Sundar *et al.*, (2011) testou 46 micro-organismos isolados na Bacia do Rio Palar/Índia. Relatou que 40 desses mostraram-se resistentes a concentrações entre 100 até 500mg/L de cromo trivalente; 5 isolados apresentaram resistência a concentrações entre 500 e 1500 mg/L de cromo trivalente e um isolado apresentou resistência superior a 1500mg/L de cromo trivalente.

Na quarta coleta, assim como na segunda e terceira, mais de 35% dos isolados apresentaram resistência à menor concentração do metal 176,76 mg/L de cromo. A concentração de 353,53 mg/L foi biocida para 15% dos isolados e de 530,28 mg/L de cromo foi biocida para mais de 25% dos isolados. Desses 90% dos isolados mostraram sensíveis à concentração de 707,07 mg/L,

enquanto que cerca de 8% apresentou resistência a 883,80 mg/L. Apenas 1 isolado foi capaz de crescer em 1060,56 mg/L de cromo. Miranda & Castilho, (1998) ao testarem *Aeromonas* de diferentes sítios de água doce do Chile, observaram alta proporção de isolados resistentes a cádmio, porém suscetíveis a concentrações de cromo hexavalente entre 5 e 700 mg/L.

Figura 6. Perfil de resistência dos isolados ao metal cromo.



O cobre desempenha uma infinidade de funções em sistemas biológicos, sendo um elemento essencial para a existência de todas as formas de vida conhecidas. Nos seres humanos, por exemplo, o cobre é o terceiro na abundância entre os metais pesados essenciais, depois de ferro e de zinco. Todos os organismos vivos necessitam de cobre um co-fator catalisador para os processos biológicos básicos, tais como a respiração, por exemplo (Colin, 2012). Os muitos usos do cobre na indústria tem difundido sua presença no ambiente, sendo encontrado em solos, lodo, nascentes e águas residuais. O

metal não pode ser destruído e tende a se acumular no solo, plantas e animais, aumentando suas concentrações nos níveis mais altos das cadeias alimentares (Georgopoulos et al., 2002).

Ao analisar a figura 6, é possível observar que na primeira e segunda coleta menos de 10% dos isolados foi resistente apenas à concentração de 127,31 mg/L e 254,62 mg/L de cobre. No entanto, a concentração intermediária de 381,93 mg/L foi biocida para mais de 35% dos isolados. A concentração de 504,29 mg/L também foi importante, sendo biocida para mais de 20% dos isolados testados. As concentrações de 636,55 mg/L e 763,86mg/L foram menos expressivas, cada uma sendo biocida para aproximadamente 5% dos isolados. Surpreendentemente, 15% dos isolados foi resistente à última faixa de concentração (891,17mg/L). Miranda & Castilho (1998) observaram padrão intermediário de resistência das *Aeromonas* isoladas de diferentes sítios de água doce do Chile. As concentrações de cobre testadas variaram entre 100 e 1000 mg/L.

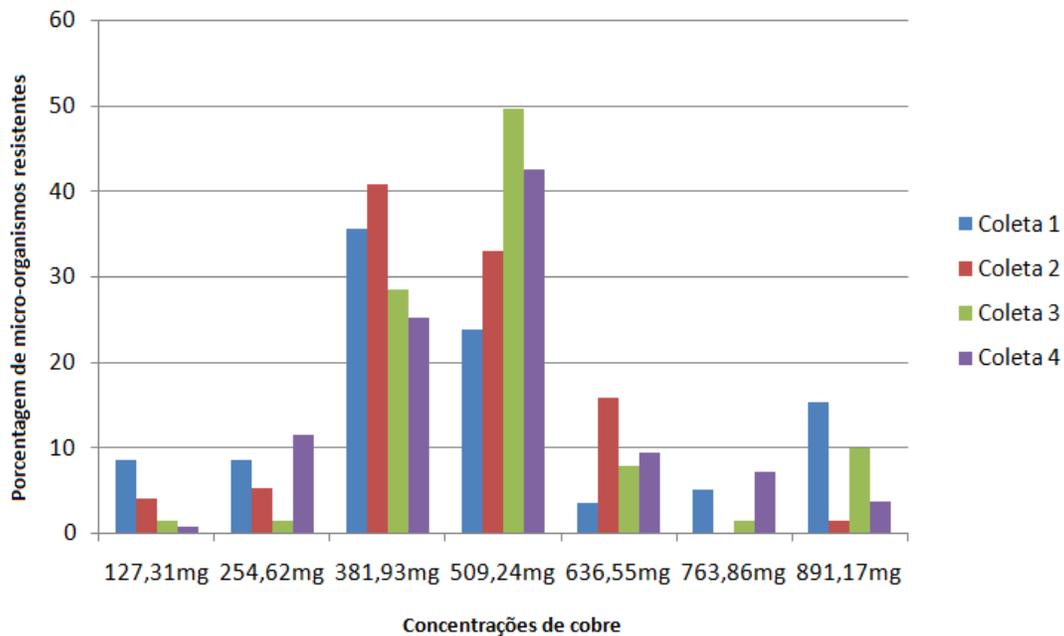
A segunda coleta teve em torno de 5% dos isolados resistentes às concentrações inferiores entre 127,31 mg/L e 254,62mg/L. A concentração biocida para a maioria dos isolados foi a de 381,93 mg/L, abrangendo mais de 40% dos micro-organismos testados e mais de 30% dos isolados foram sensíveis a 509,24 mg/L de cobre. A concentração de 636,55 mg/L foi responsável pela morte de 15% dos isolados. Nenhum micro-organismo foi sensível a 763,86 mg/L de cobre e, em torno de 2%, foi sensível a maior concentração (891,17mg/L). Segundo Karbasizaed et al, (2003) 60% das *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de infecções nosocomiais

em um hospital na localidade de Isfahan/Iran, foram resistentes à concentração de 1750 mg/L de cobre.

Na terceira coleta também poucos isolados foram resistentes às menores concentrações, com menos de 5% dos micro-organismos testados. A concentração de 381,93 mg/L foi biocida para aproximadamente 30% dos isolados, enquanto a exposição à concentração de 509,24 mg/L de cobre foi responsável pela morte de praticamente 50% dos isolados. A última concentração testada foi biocida para 10% dos isolados. Seis linhagens bacterianas resistentes ao cobre foram isoladas de efluentes de curtumes em Kasur and Rohi Nala/Paquistão. Dois isolados toleraram concentrações de cobre de até 380 mg/L, quatro delas foram resistentes a concentrações superiores a 400 mg/L (Shakoori & Muneer, 2002).

Na quarta coleta, apenas 1% dos isolados foi resistente à concentração mais baixa. Porém, na concentração 254,62 mg/L e, 381,93 mg/L observamos 12% e 25% dos isolados sensíveis, respectivamente. A exposição a 509,24mg/L de cobre foi biocida para mais de 40% dos isolados, 9% das foram sensíveis a 636,55 mg/L do metal, enquanto que 7% teve crescimento em 763,86 mg/L de cobre. Apenas 4% dos isolados foram resistentes à concentração de 891,17mg/L de cobre, ou seja, a maior concentração testada. Matyar et al. (2010) observaram que 54,3% dos isolados de *P. aeruginosa* isoladas de biofilmes foram resistentes à CIM entre 800 a 3200 mg/L de cobre.

Figura 7. Perfil de resistência dos isolados ao metal cobre



As concentrações de níquel variam muito em diferentes nichos ambientais. O metal níquel é um poluente industrial comum, encontrado em águas residuais em torno de parques industriais. Este metal é tipicamente encontrado na água nas formas Ni (0) ou Ni (II) devido a sua estabilidade na água. Toxicidade do metal níquel para os seres humanos tem recebido atenção, pois está sendo associado ao aparecimento de câncer (Macomber, 2011).

É possível observar na figura 7 que na primeira coleta os micro-organismos foram menos resistentes às concentrações mais baixas de níquel, onde cerca de 5% dos isolados foram resistentes à 114,61 mg/L e 229,22 mg/L de níquel. Já para as concentrações de 458,44 mg/L e 573,05 mg/L encontramos mais de 20% dos isolados resistentes. A concentração de 687,66 mg/L de níquel foi biocida para 10% dos isolados e a concentração de 802,27 mg/L foi capaz de impedir o crescimento de cerca de 22% dos isolados. Alam et al. (2010), tiveram resultados bastante semelhantes ao testarem bactérias

isoladas de efluentes de curtume em Kanpur/Índia observaram resistência de 15.2% dos isolados à concentração de 100mg/L, 52.5% à concentração de 200mg/L, 18.2% à concentração de 400mg/L, 1.6% à concentração de 800 mg/L e 1.0% resistentes à concentração de 1600 mg/L de Ni<sup>+2</sup>.

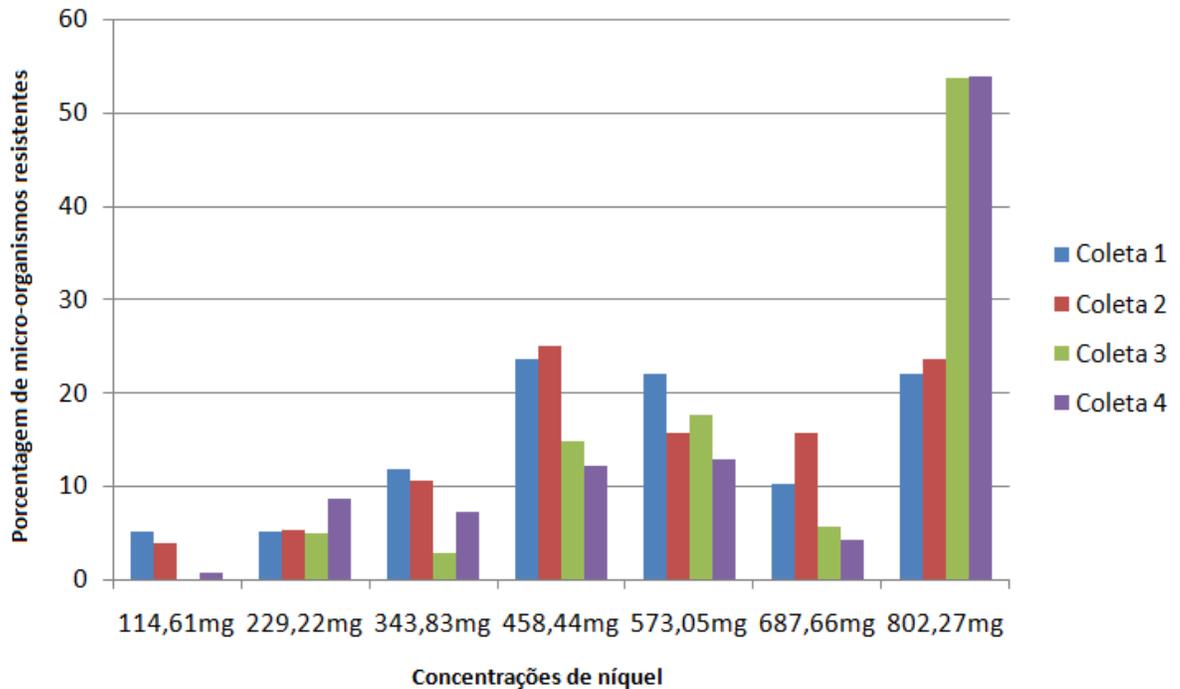
A segunda coleta teve percentuais semelhantes à primeira para o metal níquel. Temos 5% dos isolados resistentes às duas concentrações mais baixas e na concentração superior (802,27 mg/L) houve crescimento de 24% dos isolados. Castro-Silva et al., (2003), ao estudarem micro-organismos isolados de ambientes de mineração de carvão, observaram que 5,20% era resistente a concentrações superiores a 452,25 mg/L de níquel.

Na terceira coleta observamos cerca de 5% dos isolados foram resistentes à concentração de 229,22 mg/L e menos de 5% resistentes à concentração de 343,83 mg/L. Cerca de 15% foram resistentes à 458,44 mg/L de níquel e mais de 15 % de resistentes a 573,05 mg/L de níquel. Para maioria dos isolados (54%), a concentração de 802,27 mg/L não foi suficiente para impedir o crescimento das bactérias testadas. Cabral (2012) ao estudar isolados de amostras de solo e lodo de esgoto de ambientes contaminados com mercúrio, descreveu um exemplar de *Pseudomonas putida* resistente a concentrações de 1000 µM de NiCl<sub>2</sub>.

A última coleta teve resultados semelhantes à terceira para o metal níquel. Observamos a concentração de 687,66mg/L foi biocida para menos de 5% dos micro-organismos testados e como na terceira coleta, cerca de 54% da bactérias não apresentaram fenótipo de sensibilidade para a maior concentração (802,27 mg/L) de níquel testadas. Abou-Shanab et al.(2007) observaram que 100% das bactérias isoladas de solos serpentina

(caracterizados pelas altas concentrações de níquel) foram resistentes a 40mM de níquel.

Figura 8. Perfil de resistência dos isolados ao metal níquel.



Embora as concentrações de metais na água enquadrem-se nos limites da legislação vigente, observamos organismos resistentes aos metais pesados testados. Logo, é preciso manter-se atento aos índices de poluição e aumentar a abrangência do tratamento do esgoto doméstico e industrial que deságua no Rio dos Sinos.

## 5. Conclusões

As bactérias isoladas do Rio do Sinos apresentaram um elevado perfil de resistência, com 77,32% dos isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 49,03% foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos, sendo possível relacionar essa resistência ao uso corriqueiro desses antimicrobianos na prática clínica.

Os valores de DBO e DQO inferem que o trecho superior (Três Coroas) tem água de qualidade superior ao trecho inferior (Novo Hamburgo e Esteio).

Foram identificados micro-organismos dos gêneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Staphylococcus* e *Salmonella*; os gêneros que apresentaram maior perfil de resistência aos antimicrobianos foram *Escherichia* e *Pseudomonas*.

Dos micro-organismos isolados nesse estudo, 44,39% apresentaram resistência à MIC acima de 802,27 mg/L de níquel; 40,97% foram resistentes à MIC acima de 509,24 mg/L do metal cobre e 12,92% dos micro-organismos foram resistentes MIC acima de 707,04 mg/L de cromo.

## **6. Perspectivas**

1. Identificar os micro-organismos resistentes a metais pesados.
2. Sequenciar os micro-organismos multirresistentes a antimicrobianos.
3. Concluir as identificações bioquímicas e confirmar com identificações moleculares.

## 7. Referências bibliográficas

ABOU- SHANAB, R.A.I.; VAN BERKUM, P.; ANGLE, J.S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere**. v.68, p.360–367, 2007.

ABREU, E.T.; PRETTO, J.A.; CALEARE, A.O.; TAVARES, R.G.; NAKAMURA, C.V.; Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. **Acta Scientiarum Technology**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2010.

ALAM, M.Z.; AHMAD, S. MALIK, A. Prevalence of heavy metal resistance in bacteria isolated from tannery effluents and affected soil. **Environmental Monitoring and Assessment**. v.3, p.335-340, 2010.

ALANIS, A.J, Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? **Archives of Medical Research** v.36, p. 697–705, 2005.

ALBUQUERQUE, S.A. Cartilha ecológica: educação ambiental. Curitiba, **Educarte**, 2001.

ANA- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil, informe especial, 2012.

ANA- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. Panorama da qualidade da águas superficiais, 2012.

ANDRADE, N.P.C.; FILHO, F.M.; CARRERA, M.V.; JATOBÁ E SILVA, L.; FRANCO, I.; DA COSTA, M.M. Microbiota bacteriana do *Macrobrachium amazonicum* do Rio São Francisco. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.3, p.176-180, 2010.

ANTUNES,G.S. **Manual de diagnóstico bacteriológico**. 2ed. Porto Alegre: UFRGS. 278. 1995.

BASU, M.; BHATTACHARYA, A.; PAUL, K. Isolation and Characterization of Chromium-Resistant Bacteria from Tannery Effluents. **Environmental Contaminant Toxicology**. v.58, p. 535- 542, 1997

BERTONA,E.; RADICE, M.; RODRÍGUEZ, C.H.; BARBERIS, C.; VAY, A.;. FAMIGLIETTI, C.;. GUTKIND, G. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia enzimática a las cefalosporinas de tercera generación en

Enterobacter spp. **Revista Argentina de Microbiología**. v.37, p. 203-208, 2005.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde . **Manual prático de análise de água**. 2. ed. rev. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 2006. 146p.

CABRAL, L. Isolamento de bactérias tolerantes e fatores que afetam a transformação de metilmercúrio por *Pseudomonas putida* V1 *in vitro*. Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, UFRGS. 2012.

CACCI, L. Estudo epidemiológico-molecular das infecções por *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao Imipenem em pacientes hospitalizados. Dissertação de mestrado em Ciências. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

CANAL, N. Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos, RS. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS. 2010.

CARDONHA, A.M.S.; REGINE, H.S.F.; VIEIRA, D.P.; RODRIGUES, D.; MACRAE, A.; PEIRANO, G.; TEOPHILO, G.N.D. Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. **International Microbiology**. v. 7, p.213–218, 2004.

CARDOSO, A.L.S.P., TESSARI, E.N.C. ; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I.; GAMA N.M.S.Q. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descavado. **Arquivo do Instituto de Biologia, São Paulo**. v.68, n.1, p.19-22, jan./jun., 2001.

CASTILHOS, D. D.; TEDESCO, M. J.; VIDOR, C. Rendimentos de culturas e alterações químicas do solo tratado com resíduos de curtume e cromo hexavalente. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa**. v. 26, p. 1083-1092, 2002.

CASTRO-SILVA, M.A.; LIMA, A.O. S.; GERCHENSKI, A.V.; JAQUES, D. B.; RODRIGUES, A.L; SOUZA, P.L.; RÖRIG, L.R. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.34 (Suppl.1), p.45-47, 2003.

CHATTOPADHYAY, M.K.; GROSSART, H.P.; Antibiotic and heavy metal resistance of bacterial isolates obtained from some lakes in northern Germany. **NSHM Journal of Pharmacy and Healthcare Management**. v. 2, p. 44-45 2011

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v.65, n. 2, p. 232-260, 2001.

CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Curtumes, P+L, 2009.

COLIN, V.L.; VILLEGAS, L.B.; ABATE, C.M.; Indigenous microorganisms as potential bioremediators for environments contaminated with heavy metals. **International Biodeterioration & Biodegradation.** v.69, p. 28-37, 2012.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº 357, de 18 de março de 2005. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 07.03.2013

CORBI, J.J.; STRIXINO, S.T.; SANTOS, A.; DEL GRANDE, M. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo –Brasil). **Revista Química Nova.** v. 29, n.1, p.61-65, 2006.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C. DE F.B.; IKUNO, A.A.; BÜRGER, K.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Resistência antimicrobiana de cepas de Salmonella spp. isoladas de abatedouros de aves. **Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo,** v. 73, n.2, p.157-163, 2006.

CUNHA, B.A. Antibiotic resistance. **Drugs of Today.** V.34, p. 691-698, 1998.

CUNHA, A.C.; SOUZA, J.A.; GOMES, W.L.; BAÍA, J.S.F.; CUNHA, H.F.A. Estudo Preliminar Sobre a Variação Espaço-Temporal de Parâmetros da Qualidade da Água no Igarapé da Fortaleza. Capítulo 7. 2003.

DOMINGUES, V. O.. STÜKER, F.; MICHELOT. T.M.; REETZ, L.G.; HÖNER, R. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias. **Saúde, Santa Maria,** v. 33, n 1: p 15-19, 2007.

FARIA, C.M.; MORANDI, I.C. A difícil recuperação de arroios em áreas urbanas. **Pesquisa Ecos.** v.3, n.6, p.22, 2002.

FEITOSA, R.J.P. Prevalência de infecções hospitalares por bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose, em um hospital de Campina Grande, Paraíba. 2012

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AO MEIO AMBIENTE - FEPAM - Relatório Sinos, Eventos de mortandade de peixes, Rio dos Sinos. Segunda edição revisada e atualizada, 2010.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AO MEIO AMBIENTE – FEPAM.  
Disponível em [http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade\\_sinos/sinos.asp](http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade_sinos/sinos.asp).  
Acesso em 31.01.2013

GEORGOPOULOS, P.G.; ROY, A.; YONONE-LIOY, M. J.; OPIEKUN, R.E.; LIOY, P. J. Environmental cooper: its dynamics and humam expousure issues. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part B, 4, p. 341–394, 2001

GIOVANELLA, P.; BENTO, F.; CABRAL, L.; GIANELLO, C.; CAMARGO, F.A.O. Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio. **Química Nova**, v. 34, n.2, p.232-236, 2011.

GOÑI-URRIZA, M.; RAYMOND, N.; ARPIN, C.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C.; CAPDEPUY, M. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae and Aeromonas spp. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n.1, p. 125-132. 2000.

GUIMARÃES, G.; FRANÇA, C.A.; KRUG, F.S.; PEIXOTO, R.M.; KREWER, C.C.; LAZZARI, A.M.; DA COSTA, M.M. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de Staphylococcus spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. **Pesquisas Veterinárias Brasileiras**.v. 32, n.12, p.1219-1224, dezembro 2012

HECK, K. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias isoladas de processo de compostagem. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS, 2011.

HENRIQUES, I.S.; FONSECA, F; ALVES, A; SAAVEDRA, M.J.; CORREIA, A.; Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. **Research in Microbiology**. v. 157, p. 938–947, 2006.

HIRSCH, D.; JÚNIOR, D.J.P; LOGATO, P. V. R.; PICCOLI, R. H.; FIGUEIREDO, H.C.P.; Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de Aeromonas móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciências agrotécnicas, Lavras**. v. 30, n. 6, p. 1211-1217, nov./dez., 2006

HÖLZEL, C.S.; SCHWAIGER, K.; HARMS, K.; KÜCHENHOFF, H.K.; KUNZ, A.; MEYER, K.; MÜLLER, C.; BAUER, J. Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. **Environmental research**. v.110, p. 318-326, 2010

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico de 2008. Acesso em 27/04/2013. <http://www.ibge.gov.br>

ISAAC MARQUEZ, A.G; DAVILA, C.M.L; PECH, P.P.K; SEGOVIA, P.T; Calidad sanitaria de los suministros de agua para consumo humano em

Campache. **Revista de Salud Pública de México**. v. 36, n.06, p. 655-661, 2004.

JIMENEZ, R.S.; DAL BOSCO, S.; CARVALHO, W.A. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural esolecita- influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. **Revista Química Nov**. v. 27, n. 5, p. 734-738, 2004.

JORDÃO, C.L.; SILVA, A.L.; PEREIRA, J.L; BRUNE, W.; Contaminação por cromo de águas de rios provenientes de curtumes em Minas Gerais. **Revista Química Nova**. V.22, n.1, p.47-52, 1999.

KARBASIZAED, V.; BADAMI, N.; EMTIAZI, G. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. **African Journal of Biotechnology**. v.2, n.10, p. 379-383, October 2003

KAYE, K.S.; ENGEMANN, J.J.; FRAIMOW, H.S., ABRUTYN, E.; Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. **Infectious Disease Clinics of North America**. v.18, p.467–511, 2004.

KING, L. D.; ALVAREZ, V.; FONTES, L. E.; FONTES, M.P. F.; Soil Heavy Metal inViçosa, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p. 823, 1996.

KOCH, C.R.; RIBEIRO, J.C.; SCHNOR, O.H; ZIMMERMANN,B.S; MÜLLER,F.M.; D'AGOSTIN, J.; MACHADO, V.; ZHANG, L.; Resistência antimicrobiana dos uropatógenos em pacientes ambulatoriais, 2000-2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.41, n.3, p. 277-281, mai-jun, 2008.

KUMMERER, K . Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**. v.75, p. 417–434, 2009a.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. **Chemosphere**. v.75, p. 435–441, 2009b.

LIBÂNIO, P.A.C; CHERNICHARO, C.A.L; NASCIMENTO, N.L.; A dimensão da qualidade de água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.10, n. 3, p.219-228, 2005.

MacFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore : Lippincot Williams & Wilkins, p. 912, 2000.

MACOMBER, L.; HAUSINGER, R.P. Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. **Metallomics**. v.3, p. 1153–1162, 2011.

MARTÍNEZ- MARTÍNEZ, L.; CALVO, J. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v.28(Supl 2), p.25-31 2010.

MASON, M.F. Some Realities and Results of Proficiency Testing of Laboratories Performing Toxicological Analyses **Journal Analytical Toxicology**. v.5, n.5, p. 201-208, 1980.

MATYAR, F.; AKKAN, T.; UÇAK, Y.; ERASLAN, B. Aeromonas and Pseudomonas: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). **Environmental Monitoring Assessment**. v.167, p. 309–320, 2010.

MERTEN, G. H., MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Revista de Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. v.3, n.4 p. 33 – 38 out/dez 2002

MIRANDA, C.D.; CASTILHO, G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **The Science of the Total Environment**. v.224 , p. 167-176, 1998.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q.; Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v.36, n.3, p. 370-374, 2002.

MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal Veterinaria Research Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005

MOURA, A.C.; ASSUMPÇÃO, R.A.B; , BISCHOFF, J; Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do Rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006. **Arquivo do Instituto de Biologia, São Paulo**, v.76, n.1, p.17-22, jan./mar., 2009

NACHTIGALL, G. Avaliação da diversidade e do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Enterococcus sp.* isolados nas águas do arroio Dilúvio – Porto Alegre, RS. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente. UFRGS. 2011

NAIME, R. & FAGUNDES, R.S.; Controle da qualidade da água do Arroio Portão, RS. **Pesquisa em Geociências**, v.32 n.1, p. 27-35. 2005.

NAIME, R & NASCIMENTO, C.A. Panorama do uso, distribuição e contaminação das águas superficiais no Arroio Pampa na Bacia do Rio dos Sinos. **Estudos tecnológicos** – vol.5, n.1, p. 101-120, 2009 (a).

NAIME, R & NASCIMENTO, C.A. Monitoramento físico, químico e microbiológico das águas do Arroio Pampa em Novo Hamburgo, RS.

**Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 6, n. 2, p. 410-432, mai/ago 2009 (b).

NAIME, R & NASCIMENTO, C.A. Monitoramento de metais pesados do Arroio Pampa em Novo Hamburgo, RS. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 6, n. 2, p. 433-450, mai/ago 2009 (c).

OLIVEIRA, A.C.; SILVA, R.S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. v.10, n.1, p. 189-197, 2008.

OLIVEIRA, C. F.; DAL FORNO, N.L.F.; ALVES, I.A.; HORTA, J.A.; RIEGER, A.; ALVES, S.H.; Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.42, n.5, p. 556-560, set-out, 2009.

OLIVEIRA, D.V; CARVALHO, T.; ZANIN, J.G.; NACHTIGALL, G.; MEDEIROS, A. W.; FRAZZON, A. P. G.; VAN DER SAND, S. T.; Qualidade da água e identificação de bactérias Gram-negativas isoladas do Arroio Dilúvio em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Evidência, Joaçaba** v. 12 n. 1, p. 51-62, janeiro/junho 2012.

OLIVEIRA, J.P.W; SANTOS, R.N.S; PIBERNAT, C.C.; BOEIRA, J.M.B.; Genotoxicity and Physical Chemistry Analysis of waters from Sinos River (RS) using *Allium cepa* and *Eichhornia crassipes* as bioindicators. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. P. 15-22, 2012.

OLIVEIRA, M.F.; CORÇÃO, G.; VAN DER SAND, S.T. An evaluation of transient bacterial population in a polluted bathing site in Porto Alegre – Brazil. **Biociências**, Porto Alegre, v. 14, n.2, p. 136-143, dez. 2006.

PASSIANOTO, C. .; CASTILHOS, D.; CASTILHOS, R. M. V.; LIMA, A. C. R. de; LIMA, C. L. R. de; Atividade e biomassa microbiana no solo com a aplicação de dois diferentes lodos de curtume. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7 n 2. p. 125-130 mai-ago, 2001.

PAZ, V.P.S.; TEODORO, R.E.F.; MENDONÇA, F.F.; Recursos hídricos, agricultura irrigada e meio ambiente. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.3, p.465-473, 2000.

Parecer do Ministério Público/RS, Documento DAT-MA Nº 0616/2008 Unidade de assessoramento ambiental e geoprocessamento das bacias hidrográficas.

PINTO, K.C., Avaliação Sanitária das águas e areias as Baixada Santista, São Paulo. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2010.

PONTES, D. S.; PINHEIRO, F. A.; LIMA-BITTENCOURT, C. I. ; GUEDES, R. L. M., CURSINO, L.; BARBOSA, F.; SANTOS, F. R.; CHARTONE- SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Multiple Antimicrobial Resistance of Gram-Negative Bacteria from Natural Oligotrophic Lakes Under Distinct Anthropogenic Influence in a Tropical Region. **Microbiology Ecology** v. 58: p. 762–772, 2009.

RAUCCI, G.D.; POLETTE, M. Subsídios para análise da capacidade de suporte da praia central de balneário Camboriú – SC. Perfil do Usuário In.XIV Semana Nacional de Oceanografia Rio Grande - RS Livro de síntese do evento citado: Furg, p. 117-118 2001.

READ, A.F.; DAY, T.; HUIJBEN, S.; The evolution of drug resistance and the curious orthodoxy of aggressive chemotherapy. PNAS | vol. 108 | suppl. 2 | 10871–10877| June 28, 2011.

Relatório de vistoria, Documento DAT-MA Nº 2568/2011 ,unidade de assessoramento ambiental de água e esgoto sanitário. FEPAM- RS.

SCHNEIDER, R.N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de Escherichia coli obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Biotemas**. v.22 n.3, p. 11-17, setembro de 2009

SHAKOORI, A.R.; MUNEER, B. Copper-Resistant Bacteria from Industrial Effluents and Their Role in Remediation of Heavy Metals in Wastewater. **Folia Microbiology**. v. 47, n.1, p. 43-50, 2002.

SHIBATA, T.; SOLO GABRILE, H.M.; FLEMING, L.E.; ELMIR, S.; Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. **Water research**. v. 38, p. 3119 – 3131, 2004.

SILVEIRA,G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M; TEREZI, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Revista Química Nova**. v. 29, N. 4, p. 844-855, 2006

SPRICIGO, G. O rural no vale dos Sinos (RS): situação sócio-econômica e estratégias de desenvolvimento para região. Dissertação de mestrado no Programa de Pós-graduação em desenvolvimento rural/ UFRGS. 2007

STRIEDER, M.N.; RONCHI, L.H.; STENERT, C.; SCHERER, R.T.; NEISS, U.G. Medidas biológicas e índices de qualidade da água de uma microbacia com poluição urbana e de curtumes no sul do Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**. v.28, n.1, p. 17-24, janeiro/abril 2006.

SUNDAR, K.; MUKHERJEE, A.; SAQUID, M.; CHANDRASEKARAN, N. Cr (III) bioremoval capacities of indigenous and adapted bacterial strains from Palar river basin. **Journal of Hazardous Materials**. v.187, p. 553–561, 2011

TAVARES, T.M.; CARVALHO, F.M.; Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. **Revista Química Nova**, v. 15, n.2, p. 147 - 154 ,1992.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.33, n.3, p.281-301, mai-jun, 2000.

VICTORETTE, T. W.D. B.; BRENTANO, D.M. Qualidade da água da Bacia Hidrográfica do Rio Ratonas, Florianópolis/SC, nas estações de primavera e verão. Caderno das águas. p.44-52, 2011

VIRGA, R.S.P.; GERALDO, L.P.; SANTOS, F.H. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. **Ciência Tecnologia e Alimentação, Campinas**. v.27, n.4, p. 779-785, out.-dez. 2007.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**. V.410, p.223 -236. 1998

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E.; Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Revista Química Nova**, v. 21, n.5, 1998.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Meios de cultura para isolamento e crescimento de bactérias

<b>8.1.1 Agar Cetrimide</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Digestão Pancreática de Gelatina	20
Cloreto de Magnésio	1,4
Sulfato de Potássio	10
Cetrimide	0,3
Agar	15
Água	1000,0mL
<b>8.1.2 Agar Eosina Azul de Metileno</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Digestão Péptica de Tecido Animal	10
Fosfato Dipotássico	2
Azul de Metileno	0,065
Sacarose	5
Eosina-Y	0,4
Lactose	5
Agar	13,5
<b>8.1.3 Agar Müller Hinton</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Infusão de Carne	300
Caseína Ácida Hidrolisada	17,5
Amido	1,5
Agar	17
Água	1000,0mL
<b>8.1.4 Agar Padrão Contagem de Heterotróficos</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Digestão Enzimática de Caseína	5
Extrato de Levedura	2,5
Dextrose	1
Agar	15
Água	1000,0mL
<b>8.1.5 Agar Triptona de Soja (TSA)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Digestão Pancreática de Caseína	15
Digestão Papaica de Farinha de Soja	5
Cloreto de Sódio	5
Agar	15

Água	1000,0mL
<b>8.1.6 Agar (R-2 A)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Extrato de Levedura:	0.50
Protease Peptona:	0.50
Caseína Hidrolisada:	0.50
Amido:	0.50
Glicose:	0.50
Fosfato Hidrogênio Dipotássico:	0.30
Sulfato de magnésio anidro:	0.024
Piruvato de sódio:	0.30
Agar:	15.00
Água	1000,0mL
<b>8.1.6 Caldo Lactose</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Extrato de Carne	3
Peptona Bacteriológica	5
Lactose	5
Água	1000,0mL
<b>8.1.7 Caldo Triptona de Soja (TSB)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Digestão Pancreática de Caseína	17
Digestão Pancreática de Farinha de Soja	3
Cloreto de Sódio	5
Fosfato Dipotássio	2,5
Dextrose	2,5
Água	1000,0mL
<b>8.1.8 Caldo Verde Brilhante Bile 2%</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Peptona de Gelatina	10
Bile bovina	20
Lactose	10
Verde Brilhante	0,0133
Água	1000,0mL