

**Identificação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias
isoladas de efluente líquido proveniente do polo petroquímico – Triunfo-RS**

Maria do Carmo Ferreira Gonçalves^{1*}, Sueli Teresinha Van Der Sand²

¹ Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul

*E-mail: maria.cfg09@gmail.com

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas
apresentado conforme as normas técnicas da
Revista Brasileira de Biociências.

Novembro/2015

**Identificação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias
isoladas de efluente líquido proveniente do polo petroquímico – Triunfo-RS**

Maria do Carmo Ferreira Gonçalves^{1*}, Sueli Teresinha Van Der Sand²

¹ Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Autor para correspondência: maria.cfg09@gmail.com

O presente trabalho está sendo apresentado conforme as normas da revista Brasileira
de Biociências.

RESUMO:

Atualmente a necessidade de um uso sustentável e responsável dos recursos hídricos vem sendo amplamente discutido por diferentes profissionais. As condições e padrões de lançamento de efluentes são estabelecidas pela resolução CONAMA 357/2005, posteriormente complementada pela resolução CONAMA 397/2008. Considerando que a redução da população microbiana influenciará diretamente na degradação biológica do efluente é importante investigar a capacidade dos microrganismos sobreviverem em condições de estresse como, por exemplo, ambientes com antimicrobianos e metais pesados. Uma maior resistência a estes compostos significaria a permanência das bactérias podendo atuar no tratamento biológico do efluente. Também demonstraria a presença destes produtos nas etapas iniciais do tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos e a metais pesados em bactérias isoladas de amostras de efluente petroquímico. Foram analisados 30 isolados bacterianos, destes 22 eram Gram negativos e oito isolados Gram positivos. Todos os isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos e os considerados multirresistentes foram testados com metais pesados. Os resultados do antibiograma mostram que as bactérias Gram negativas apresentaram maior taxa de resistência a aztreonam e cefpodoxima e as Gram positivas resistiram mais à ação da eritromicina, ceftazidima e cefepima. Dos isolados submetidos à ação de metais pesados, 78,6% apresentaram resistência a $2,88\text{g.L}^{-1}$ de nitrato de chumbo, 71,4% dos isolados resistiram a $5,76\text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de zinco heptahidratado e 42,9% dos isolados apresentaram resistência à concentração de $2,4\text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de cobre pentahidratado.

Palavras-chave: efluentes, resistência, antimicrobianos, metal pesado

Identification of antimicrobial and heavy metal resistance profile of bacteria isolated from wastewater from a petrochemical complex - Triunfo-RS

ABSTRACT:

Actually the need for sustainable and responsible use of water resources has been widely discussed by many different professionals. The conditions and effluent discharge standards are set by CONAMA Resolution 357/2005, later amended by CONAMA Resolution 397/2008. Considering that the reduction of the microbial population will directly influence the biological degradation of the wastewater, it is important to investigate the ability of microorganisms survive in conditions of stress, for instance, environments with antimicrobials and heavy metals. A bigger bacterial resistance to these compounds would mean the permanence of these individuals can acting in the biological treatment of wastewater. It also demonstrates the presence of these products in the initial stages of treatment. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial and heavy metals resistance profile in bacteria isolated from petrochemical wastewater samples. Thirty bacterial isolates were analyzed of these 22 were Gram-negative bacteria and eight Gram-positive isolates. All isolates were subject to the antimicrobial sensitivity testing and regarded as multidrug resistant were tested with heavy metals. The antibiogram results show that the Gram-negative bacteria had a highest rate of resistance to aztreonam and cefpodoxime and the Gram-positives more resistant by the action of erythromycin, ceftazidime and cefepime. From the isolates subjected to the action of heavy metals, 78,6% were resistant to 2,88g.L⁻¹ of lead nitrate, 71,4% of isolates resisted 5,76g.L⁻¹ of zinc sulfate heptahydrate and 42,9% of the isolates were resistant to the concentration of 2,4g.L⁻¹ of copper sulphate pentahydrate.

Key-words: wastewaters, resistance, antimicrobials, heavy metal

INTRODUÇÃO:

A atividade industrial, principalmente de origem química, produz efluentes líquidos que devem ser eficientemente tratados a fim de evitar a contaminação ambiental. O tratamento biológico de um efluente depende da natureza e concentração dos contaminantes e do processo biológico adotado. Dentre os fatores controlados neste sistema estão: pH, suprimento de nutrientes aos microrganismos degradadores, tempo de retenção do efluente no sistema, temperatura, aeração, entre outros (Santos *et al.*, 2010).

A necessidade de um uso sustentável e responsável dos recursos hídricos vem sendo discutido por diversos pesquisadores, ambientalistas e representantes da sociedade civil. Dados alarmantes sobre a distribuição desigual de água doce, a má utilização deste recurso e a possibilidade da sua escassez têm provocado uma maior preocupação por parte das entidades fiscalizadoras, além do estabelecimento de leis ambientais mais severas para evitar o descarte de efluentes de forma inadequada (Bandeira, 2007).

As condições e padrões de lançamento de efluentes nos corpos d'água no Brasil são estabelecidas pela resolução CONAMA 357/2005, posteriormente complementada pela resolução 397/2008, e pelas resoluções e leis estaduais (Pinheiro, 2010).

No contexto da sustentabilidade, busca-se um tratamento biológico para efluentes de indústrias petroquímicas e refinarias de óleo, visando à retirada dos compostos recalcitrantes. Com esta finalidade, torna-se necessário o isolamento, a identificação e a caracterização de microrganismos do efluente petroquímico em estudo, tendo em vista o processo e adaptação às condições de estresse e a possibilidade de apresentar propriedades degradativas diferenciadas (Barbosa *et al.*, 2007).

A resistência aos antimicrobianos, apesar de ser um fenômeno natural e de pressão seletiva, tornou-se um problema de saúde pública devido ao uso de antimicrobianos em larga escala e seu despejo em esgotos domésticos, favorecendo a interação com agentes

patogênicos, promovendo nestes a transferência e seleção de genes de resistência (Batista *et al.*, 2007). Bactérias comensais que são tolerantes a antimicrobianos produzem reservatórios de resistência que podem ser transmitidos para bactérias patogênicas (Caliman & Marin, 2012).

É importante a investigação da sobrevivência dos microrganismos a condições de estresse por ser um fator determinante para a tolerância bacteriana aos antimicrobianos. Este tema tem sido uma preocupação emergente no contexto da saúde pública em razão da ampla disponibilidade destes produtos no ambiente (Martinez, 2009), pois isto pode gerar, ainda que indiretamente, tolerância microbiana à desidratação e oxidação, a detergentes e a metais pesados (Meirelles-Pereira *et al.*, 2002).

Metais pesados como, por exemplo, chumbo, ferro, cádmio e cobre são liberados juntamente ao efluente das refinarias de petróleo. As principais consequências para o meio ambiente são: intoxicação dos organismos aquáticos, severas modificações na fauna e flora aquáticas e redução das populações de espécies sobreviventes (Mariano, 2001).

Os métodos convencionais de remoção de metais de efluentes industriais são: precipitação, redução ou oxidação química, troca iônica, filtração, tratamento eletroquímico, osmose reversa, tecnologia de membranas e recuperação por evaporação (Ahluwalia & Goyal, 2007). Estes processos podem ser ineficazes ou extremamente caros, especialmente quando os metais encontram-se em concentrações na faixa entre 1-100 mg/L de resíduo (Lou & Lin, 2008).

Os metais pesados interferem na atividade metabólica e no crescimento das populações microbianas impactando, por consequência, na diversidade microbiológica (Roane & Pepper, 2000). Além disso, estes elementos causam danos à estrutura da membrana celular e do DNA, alteração da especificidade das enzimas e rompimento das funções celulares (Da Silva, 2011).

O principal mecanismo de extrusão de íons metálicos celular ocorre por transporte ativo. No entanto, as reações de oxidação, redução, metilação e desmetilação também desempenham um papel importante frente ao estresse (Leedjäv *et al.*, 2008). Dentre os mecanismos de resistência bacteriana a antimicrobianos mais comuns estão a bomba de efluxo (Teitzel & Parsek, 2003) e atuação de plasmídeos (Sobecky, 1999). Este último mecanismo também atua na resistência a metais pesados (Perci, 1994).

A presença de agrupamento de genes em plasmídeos é benéfica para a sobrevivência do organismo, pois estes poderão ser transferidos juntos em um evento de conjugação (Lawrence, 2000). Portanto, em um ambiente com múltiplos fatores de estresse, por exemplo, antimicrobianos e metais pesados, é ecologicamente favorável que a bactéria adquira resistência a ambos os fatores. Se a resistência for mediada por plasmídeos, aquelas bactérias que possuem agrupamento de genes de resistência terão mais facilidade em transferi-los e estes indivíduos terão, por consequência, uma maior chance de sobrevivência no ambiente estressado. Em tal situação, pode-se sugerir uma associação entre resistência a antimicrobianos e tolerância a metais pesados (Spain & Alm, 2003).

As bombas de efluxo são proteínas integrantes da membrana plasmática e têm sido responsabilizadas por diversos casos de resistência a antimicrobianos já que as mesmas são expelidas para fora da célula através deste mecanismo (Costa *et al.*, 2008).

A importância de se estudar a incidência de resistência microbiológica se dá pelo fato de que a redução da população microbiana influenciará diretamente na degradação biológica do efluente. Uma maior resistência a estes compostos significaria a permanência das bactérias podendo atuar no tratamento biológico do efluente. Também demonstraria a presença destes produtos nas etapas iniciais do tratamento, visto que lançamento final do efluente deve atender os parâmetros exigidos na resolução CONAMA 357/2005. O objetivo deste trabalho foi

avaliar o padrão de resistência a antimicrobianos e a metais pesados de bactérias Gram negativas e positivas isoladas em efluente petroquímico.

MATERIAL E MÉTODOS:

Os isolados analisados neste trabalho são provenientes do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL) - Superintendência da Corsan, sendo os resíduos líquidos oriundos das atividades operacionais das indústrias do Polo Petroquímico do Sul localizado na cidade de Triunfo, Rio Grande do Sul. As coletas foram realizadas nos meses de janeiro, abril e maio de 2015. Foram amostradas a caixa de entrada do efluente, tanque de aeração, lodo ativado e quatro das oito lagoas de estabilização presentes na planta de tratamento, sendo elas as de número 1, 3, 6 e 8 (Fig. 1).

O efluente proveniente da caixa de entrada e do tanque de aeração foi manipulado da seguinte forma: 40mL de amostra foram adicionados a 160mL de meio mínimo mineral (constituição: 2g de K_2HPO_4 ; 3g de KH_2PO_4 ; 6g de Na_2HPO_4 ; 1g de NH_4Cl ; 0,017g de $CaCl_2$; 5g de $(NH_4)_2SO_4$; 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,001g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 1mg de MoO_3 ; 3,3mg de $ZnCl_2$; 0,3mg de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 1mg de H_3BO_3 ; 6mg $CoCl_3 \cdot 6H_2O$; 1mg de $NiSO_4 \cdot 6H_2O$; 8,2mg de $MnSO_4$ e 4g de peptona bacteriológica para cada litro de água destilada). As amostras foram incubadas sob agitação orbital (shaker) a 25°C e 120rpm por 30 dias. A cada 10 dias, alíquotas de 100µL eram retiradas e diluídas em 10mL de água destilada (10^{-2}). Desta diluição, 100µL eram inoculados em ágar tripton de soja (TSA) e em ágar batata dextrose (BDA) utilizando a técnica *pour plate* e incubados por 24 horas a 25°C. As amostras do lodo e das lagoas de estabilização foram submetidas à diluições em série, 10^{-5} e 10^{-3} respectivamente, e inoculadas em meio ágar padrão para contagem (PCA) pela técnica *pour plate* e incubadas a 25°C por até 72 horas, sendo verificadas a cada 24 horas.

A partir destas culturas, colônias bacterianas foram selecionadas para isolamento e purificação. A seleção foi aleatória e o processo de isolamento foi realizado pelo método de esgotamento em placa contendo ágar infuso de cérebro e coração (BHI) e incubadas por 18-24h a 25°C. Para determinar a pureza dos isolados foi realizada a coloração de Gram, bem como determinar a morfologia e arranjo das bactérias e classificá-las em Gram positivas ou Gram negativas. Ao final foram obtidos 30 isolados, sendo 22 Gram negativos e oito Gram positivos. Os mesmos foram condicionados sob refrigeração de 8°C em tubos com ágar triptona de soja (TSA) inclinado.

Teste de disco difusão em ágar

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado seguindo as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), utilizando o método de difusão em disco de Kirby-Bauer (Bauer *et al.* 1966).

Os isolados Gram negativos foram testados contra 13 antimicrobianos de oito classes diferentes, sendo eles: amoxicilina + ácido clavulânico (AMC 30µg), amoxicilina (AMO 10µg), ampicilina + sulbactam (ASB 20µg), aztreonam (ATM 30µg), ceftazidima (CAZ 30µg), ciprofloxacina (CIP 5µg), cloranfenicol (CLO 30µg), cefpodoxima (CPD 10µg), gentamicina (GEN 10µg), imipenem (IPM 10µg), meropenem (MER 10µg), ácido nalidíxico (NAL 30µg) e tetraciclina (TET 30µg). Para a validação do teste foi usada a linhagem padrão *Escherichia coli* ATCC 25922.

Para verificar a susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados Gram positivos, foram utilizados 15 antimicrobianos de nove classes distintas: amoxicilina + ácido clavulânico (AMC 30µg), ampicilina (AMP 10µg), ceftazidima (CAZ 30µg), ciprofloxacina (CIP 5µg), cefalotina (CFL 30µg), cloranfenicol (CLO 30µg), cefepima (CPM 30µg),

eritromicina (ERI 15µg), gentamicina (GEN 10µg), meropenem (MER 10µg), nitrofurantoína (NIT 300µg), norfloxacin (NOR 10µg), tetraciclina (TET 30µg), teicoplanina (TEC 30µg) e vancomicina (VAN 30µg). Para conferência e validação do teste foi usada a linhagem padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cada isolado foi inoculado em ágar BHI e incubado entre 18 e 24h a 25°C. Com uma alça bacteriológica, as colônias foram suspensas em solução salina estéril 0,85% até a obtenção de uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de Mc-Farland (aproximadamente 10⁸ UFC/mL). Alcançando a turbidez desejada, com o auxílio de suabes estéreis embebidos no caldo, a amostra foi semeada uniformemente em placas contendo 4mm de altura de ágar Mueller Hinton. Os discos de antimicrobianos foram distribuídos na placa de forma equidistante e incubados à temperatura de 35°C por 24h. Após este período, os halos de inibição foram medidos e interpretados conforme o Manual CLSI (2012).

Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para metais pesados

Os isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos foram submetidos a testes de concentração inibitória mínima (CIM) de metais pesados. A técnica de micro-diluição em microplacas de 96 poços e as concentrações das soluções metálicas utilizadas foram baseadas em Da Silva (2011) com modificações.

Os isolados foram inoculados em caldo TSB e incubados a 35°C por 24h, estabelecendo o parâmetro de turbidez 0,5 na escala de McFarland. Em cada poço foi adicionado 97,5% de caldo TSB (195µL) com diferentes concentrações de soluções de sais metálicos e 2,5% de inóculo (5µL).

Os sais metálicos utilizados foram sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) com as concentrações 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6g.L⁻¹, sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄.7H₂O) com concentrações 0,18; 0,36; 0,72; 1,44; 2,88 e 5,76g.L⁻¹ e nitrato de

chumbo [Pb(NO₃)₂] com concentrações salinas 0,09; 0,18; 0,36; 0,72; 1,44 e 2,88g.L⁻¹. Para preparar as diferentes concentrações salinas foram preparadas as soluções de caldo de cultura com solução salina em tubos de ensaio de 10mL, utilizando o cálculo

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2, \text{ onde:}$$

C₁ = concentração do estoque de solução salina;

V₁ = volume de solução salina a ser misturada ao caldo de cultura;

C₂ = concentração final de sal metálico no caldo de cultura;

V₂ = volume final de solução salina + caldo de cultura (10mL).

Os experimentos foram conduzidos em triplicata. Os poços das microplacas foram divididos em: 1. Teste: inóculo e concentrado salino; 2. Controle positivo de crescimento microbiano: inóculo e meio sem concentrado salino; 3. Controle negativo de crescimento microbiano: meio sem concentrado salino e 4. Controle negativo: meio sem concentrado salino.

As microplacas foram incubadas a 35°C por 24-48h. Após este período, uma alíquota de 20µL de cada poço teste, porém sem turbidez, e de cada poço controle foram inoculadas em placas contendo TSA e incubadas a 35°C por 24h. A concentração salina na qual não houve crescimento em placa foi considerada a concentração inibitória mínima biocida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os 22 microrganismos Gram negativos e os oito isolados Gram positivos foram submetidos à ação de 13 e 15 antimicrobianos, respectivamente. Sendo que sete destes antimicrobianos foram utilizados para ambos os grupos de bactérias. A tabela 1 identifica os

isolados quanto ao ponto de coleta, classificação quanto a coloração de Gram e antimicrobianos aos quais o isolado apresentou resistência.

Conforme a figura 2, os isolados Gram negativos foram mais suscetíveis aos antimicrobianos amoxicilina + ácido clavulânico, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem e meropenem, pois nenhum isolado foi resistente. Também demonstraram sensibilidade a ampicilina + sulbactam e tetraciclina, sendo que apenas um isolado (4,5%) foi resistente a cada um destes compostos. Três isolados (13,6%) foram resistentes à amoxicilina, cinco isolados (22,7%) tolerantes ao cloranfenicol, seis isolados (27,3%) à ceftazidima e sete isolados (31,8%) resistiram à ação do ácido nalidíxico. Aztreonam e cefpodoxima apresentaram menores eficiências antimicrobianas, sendo que treze isolados (59,1%) foram resistentes a cada um destes compostos.

Quanto aos microrganismos Gram positivos, norfloxacina e teicoplanina foram os antimicrobianos aos quais as bactérias mostraram menor percentual de resistência, pois nenhum isolado apresentou resistência a estes microbianos. Sob a ação de meropenem e vancomicina, apenas um isolado (12,5%) foi resistente a cada um destes antimicrobianos. Amoxicilina + ácido clavulânico, cefalotina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina demonstraram ação antimicrobiana, sendo que dois isolados (25%) foram resistentes a cada um destes compostos. Três isolados (37,5%) foram resistentes à ação da ciprofloxacina e também três resistiram à nitrofurantoína. Quatro isolados (50%) resistiram à ação da ampicilina. Os antimicrobianos aos quais os isolados demonstraram maior resistência foram: eritromicina, cinco isolados (62,5%), ceftazidima e cefepima, seis isolados (75%) resistentes a cada antimicrobiano (Fig. 3).

Hahn *et al.* (2015), analisando microrganismos isolados do Rio dos Sinos, verificaram que os agentes mais eficientes na inibição do crescimento das bactérias foram o imipenem, gentamicina e ciprofloxacina. Da Silva (2011) e Panizzutti (2014) também observaram

resultados bem semelhantes a estes. Scheneider *et al.* (2009) observaram 100% de bactérias não-resistentes à gentamicina em amostras de águas superficiais em área próxima à produção de suínos.

Nachtigall (2011) trabalhou com organismos do gênero *Enterococcus* presentes no arroio Dilúvio e observou níveis elevados de resistência à eritromicina (87,93% dos isolados). Segundo a autora, a prevalência de enterococos resistentes à eritromicina em águas residuais tem sido amplamente divulgada na literatura e este fato é preocupante principalmente por se tratar de amostras ambientais.

No presente trabalho, os organismos Gram negativos apresentaram maior resistência às classes dos monobactâmicos e cefalosporinas e foram mais suscetíveis à ação das seguintes classes: carbapenêmicos, aminoglicosídeos e tetraciclínas. As bactérias Gram positivas foram mais resistentes às cefalosporinas e macrolídeos, enquanto que os carbapenêmicos e os glicopeptídeos demonstraram uma maior eficiência antimicrobiana (Tab. 2).

De Oliveira (2011) avaliou o perfil de resistência de bactérias Gram negativas do arroio Dilúvio localizado em Porto Alegre. Foi observada uma elevada prevalência de resistência às cefalosporinas provavelmente pelo fato destes antimicrobianos serem utilizados amplamente e de forma indiscriminada pela população em geral, causando seleção de fatores disseminadores de resistência.

Os agentes β -lactâmicos, dos quais fazem parte as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e outros, são agentes antibacterianos que atuam inibindo irreversivelmente uma enzima envolvida na formação da parede celular, prejudicando a proteção que esta estrutura confere à célula. Em Gram negativas, o principal mecanismo de resistência bacteriana a estes antimicrobianos é a produção de enzimas capazes de hidrolisar

o anel β -lactâmico, característica estrutural comum entre estes compostos (Guimarães *et al.*, 2010).

Os glicopeptídeos inibem a biossíntese da parede celular, são de uso restrito aos Gram positivos e a resistência microbiana a estes tipos de compostos é geralmente mais lenta (Guimarães *et al.*, 2010). Isto justificaria a eficiência antimicrobiana demonstrada pela teicoplanina e vancomicina neste estudo.

Neste trabalho foram classificados como multirresistentes os organismos que apresentaram tolerância a pelo menos três classes de antimicrobianos (Siqueira *et al.*, 2008). Dos isolados Gram negativos 31,8% desses foram classificados como multirresistentes (Fig. 4) e nos Gram positivos, 87,5% (Fig. 5). Estes isolados, por apresentarem maiores níveis de resistência, foram submetidos também ao teste de CIM para metais pesados.

Os isolados submetidos à ação de metais pesados apresentaram altas resistências ao nitrato de chumbo, sendo 78,6% resistentes à concentração máxima testada de $2,88\text{g.L}^{-1}$ e 21,4% com valor de CIM igual a $1,44\text{g.L}^{-1}$. Os microrganismos demonstraram também alta tolerância ao sulfato de zinco heptahidratado, 71,4% foram tolerantes à concentração de $5,76\text{g.L}^{-1}$ e 21,4% e 7,2% dos isolados foram tolerantes às concentrações $2,88$ e $1,44\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Para o sulfato de cobre pentahidratado: 35,7% dos isolados toleraram a máxima concentração testada de $9,6\text{g.L}^{-1}$, 42,9% apresentaram valor de CIM igual $2,4\text{g.L}^{-1}$ e 21,4% foram resistentes a $1,2\text{g.L}^{-1}$ (Fig. 6).

A tabela 3 apresenta os 14 isolados submetidos ao teste de CIM. Os dados disponíveis sugerem uma associação entre tolerância a antimicrobianos e metais pesados, pois a maioria dos microrganismos que apresentaram resistência a um maior número de classes de antimicrobianos resistiram também às maiores concentrações de metais testados. Todos os isolados foram tolerantes a algum dos metais em alguma das concentrações utilizadas nos

testes. Cinco isolados (35,7%), dentre os 14 testados, apresentaram valores de resistência às máximas concentrações testadas das três substâncias.

Segundo Zambom (2003), a indústria de petróleo está entre as maiores fontes antropogênicas de metais pesados, pois as águas resultantes do processo possuem contaminação por estes compostos. Cobre e cromo são dois dos metais mais comuns encontrados em efluentes de indústrias petroquímicas (Barakat, 2011). O chumbo (César *et al.*, 2012) e o zinco são metais encontrados em águas residuárias industriais, principalmente resultantes de atividades de mineração e de galvanoplastia (Vale *et al.*, 2011).

Da Silva (2011), em pesquisa desenvolvida em Porto Alegre, constatou que 90% dos isolados provenientes do processo de compostagem apresentaram resultados de CIM iguais às máximas concentrações testadas: 6g/L e 3g/L de zinco e chumbo, respectivamente. Foram levantadas duas hipóteses possíveis para estes resultados: as bactérias teriam, de fato, apresentado resistência aos metais ou os sais metálicos poderiam ter reagido com moléculas orgânicas do caldo de cultura utilizado, ficando indisponíveis para serem absorvidos pela célula.

Panizzutti (2014), que também trabalhou com cepas amostradas de composteiras, observou uma eficácia do sulfato de cobre pentahidratado como antimicrobiano, sendo que o maior valor de CIM encontrado foi de 7g.L⁻¹. Por outro lado, Hahn *et al.* (2015), observou valores de CIM entre 0,38 e 0,51 g/L de cobre, analisando microrganismos provenientes do rio dos Sinos.

Vale *et al.* (2011) observaram a inibição na germinação e no crescimento do fungo *Aspergillus niger* em concentrações de Zn(NO₃)₂.6H₂O superiores a 0,1g/L em amostras provenientes de efluente industrial.

Num estudo, 34 cepas dos gêneros *Pseudomonas* e *Alcaligenes* foram isoladas na bahia de Iquique no Chile. As amostras foram coletadas próximas a emissários submarinos

que são utilizados para lançamento de esgotos sanitários ou industriais no mar. Todos os isolados apresentaram valores de CIM maiores que 3,2 g/L para o chumbo. Para o zinco os valores de CIM ficaram entre 0,2 e 0,8 g/L e para o cobre os valores variaram entre 0,8 e 3,2g/L (Moraga *et al.*, 2003).

Em virtude de sua importância, a resistência bacteriana é um tópico muito abordado em pesquisas atuais, pois conhecer os mecanismos de ação microbiana é de suma importância para que se possa de alguma forma controlá-la.

Esta pesquisa evidenciou um alto padrão de resistência das bactérias isoladas a antimicrobianos e a metais testados. Segundo Caumo *et al.* (2010) muitos estudos têm demonstrado que o meio ambiente funciona como um grande reservatório de genes de resistência. Isto explicaria o porquê destes microrganismos presentes no efluente petroquímico apresentarem resistências elevadas a alguns antimicrobianos. Quanto à resistência aos metais pesados, há probabilidade, pela natureza do efluente bruto, que os organismos estejam bem adaptados a um ambiente com a presença deste tipo de elementos químicos.

AGRADECIMENTOS:

À Prof^a. Dr^a. Sueli Van Der Sand por ter me recebido tão gentilmente e ter aceitado me orientar. Obrigada pela amizade, generosidade e apoio em todos os momentos.

À minha família e amigos, especialmente, ao meu pai e minha mãe por serem meus primeiros e principais incentivadores.

Ao José pelo companheirismo, alegria e apoio constante no dia-a-dia.

A todos os colegas de laboratório, os quais se mostraram sempre disponíveis a ajudar no que fosse preciso.

À Themis e à Maria Jesus por partilharem comigo conhecimento, amizade e parceria.

“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande.”

Louis Pasteur

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AHLUWALIA, S.S. & GOYAL, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource technology*, 98(12): 2243-2257.

BANDEIRA, L.F.M. 2007. *Remoção de metal pesado de efluentes aquosos através de combinação dos processos de osmose inversa e adsorção*. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Química) – COPPE. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

BARAKAT, M.A. 2011. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, 4: 361-377.

BARBOSA, S.P.P., CAMINHA, M.C.C. & PAZ C.F. 2007. Identificação da microbiota bacteriana autóctone de efluentes petroquímicos no município de Fortaleza. In: II CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA JOÃO PESSOA – PB-2007.

BATISTA, M.V.A., SANTOS, M.I.S., MENEZES, L.C.S., CARNEIRO, M.R.P. & CÂNDIDO, A.L. 2007. Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* sp. multirresistentes isoladas de efluentes urbanos em Aracaju, Sergipe. *Biologia Geral e Experimental*, 7(1): 15-18.

BAUER, A.M., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C. & TURCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 36: 493-496.

CALIMAN, M.C.W. & MARIN, J.M. 2012. Comparação da resistência antibacteriana entre cepas de *Escherichia coli* isoladas de gatos diarreicos ou saudáveis, em Ituverava – São Paulo, Brasil. *ARS Veterinária*, 28(4): 244-249.

CAUMO, K., DUARTE, M., CARGNIN, S.T., RIBEIRO, V.B., TASCA, T. & MACEDO, A.J. 2010. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Revista Liberato*, 11(16): 89-188.

CÉSAR, R., COLONESE, J., SILVA, M., EGLER, S., BIDONE, E., CASTILHOS, Z. & POLIVANOV, H. 2012. Distribuição de mercúrio, cobre, chumbo, zinco e níquel em sedimentos de corrente da bacia do rio Piabanha, Estado do Rio de Janeiro. *Geochimica Brasiliensis*, 25(1): 35-45.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) 2012. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty second information supplement*. M100-S22. Wayne: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

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: 01/12/2015.

COSTA, V.C., TAVARES, J.F., AGRA, M.F., FALCÃO-SILVA, V.S., FACANALI, R., VIEIRA, M.A.R. & SILVA, M.S.D. 2008. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R.E. Fries. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18 (2): 245-248.

DA SILVA, K.H. 2011. *Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e a metais pesados em bactérias isoladas de processo de compostagem*. 94 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas e da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

DE OLIVEIRA, D.V. 2011. *Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas nas águas do arroio Dilúvio*. 73f. Dissertação (Mestrado

em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas e da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GUIMARÃES, D.O., MOMESSO, L.S. & PUPO, M.T. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3): 667-679.

HAHN, A.B.B., BAHLIS, M., BASSO, A.P. & SAND, S.T.V.D. 2015. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em micro-organismos isolados do rio dos Sinos, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 13(3): 155-164.

LAWRENCE, J.G. 2000. Clustering of antibiotic resistance genes: Beyond the selfish operon. *ASM News*, 66: 281-286.

LEEDJÄRV, A., IVASK, A. & VIRTA, M. 2008. Interplay of diferente transportes in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Bacteriology*, 190(8): 2680-2689.

LOU, J. & LIN, Y. 2008. Assessing the feasibility of wastewater recycling and treatment, efficiency of wastewater treatment units. *Environmental monitoring and assessment*, 137(1-3): 471-479.

MARIANO, J.B. 2001. *Impactos ambientais do refino de petróleo*. 279 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Estratégico) – COPPE. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MARTINEZ, J.L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*, 157(11): 2839-2902.

- MEIRELLES-PEREIRA, F., PEREIRA, A.M.S., DA SILVA, M.C.G., GONÇALVES, V.D., BRUM, P.R., DE CASTRO, E.A.R., PEREIRA, A.A., ESTEVES, F.A. & PEREIRA, J.A.A. 2002. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infection. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 287-293.
- MORAGA, R., MERINO, C. & MONDACA, M.A. 2003. Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones Marinas*, 31(1): 91-95.
- NACHTIGALL, G. 2011. *Avaliação da diversidade e do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de Enterococcus sp. isolados nas águas do arroio Dilúvio – Porto Alegre – RS*. 87f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas e da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- PANIZZUTTI, E.R. 2014. *Análise do perfil de resistência a antimicrobianos e a metais pesados em isolados bacterianos oriundos de processo de compostagem*. 20 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Básicas e da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- PERCI, R. D. 1994. Plasmídeos Bacterianos. *Akrópolis-Revista de Ciências Humanas da UNIPAR*, 2 (6).
- PINHEIRO, M.G. 2014. *Padrões químicos para a emissão de efluentes são concentrações seguras para a biota aquática?* 21 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Básicas e da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- ROANE, T.M. & PEPPER, I.L. 2000. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. *Microbial Ecology*, 38: 358-364.

- SANTOS, V.P., GIANELLO, C. & TEDESCO, M.J. 2010. *Modificações de solo e plantas após duas décadas da aplicação de lodo proveniente da ETE do SITEL do polo petroquímico (Triunfo-RS)*. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- SCHNEIDER, R.N., NADVORNY, A. & SCHIMIDT, V. 2009. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. *Biotemas*, 22(3): 11-17.
- SIQUEIRA, A.K., RIBEIRO, M.G., SALERMO, T., TAKAMIRA, R.K., LOPES, M.D., PRESTES, N.C. & SILVA, A.V. 2008. Perfil de sensibilidade e multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, de piometra e de fezes de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 60(5): 1263-1266.
- SOBECKY, P.A. 1999. Plasmid ecology of marine sediment microbial communities. *Hydrobiologia*, 401: 9-18.
- SPAIN, A. & ALM, E. 2003. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Reviews in Undergraduate Research*, 2: 1-6.
- TEITZEL, G.M. & PARSEK, M.R. 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 69(4): 2313-2320.
- VALE, M.S., ABREU, K.V., GOUVEIA, S.T., LEITÃO, R.C. & SANTAELLA, S.T. 2011. Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentosos *Aspergillus niger* isolado de efluente industrial. *Engenharia Sanitária Ambiental*, 16(3): 237-244.
- ZAMBOM, G.A. 2003. *Remoção de chumbo (Pb²⁺) utilizando Zeolita natural clinoptilolita*. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS:



Figura 1. Mapa mostrando uma vista geral do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL), localizado em Triunfo-RS, em destaque os pontos de coleta de amostras. (29°50'52''S, 51°22'11''O). Fonte: Google Earth

Tabela 1. Identificação dos isolados quanto ao ponto de coleta, classificação Gram e antimicrobianos aos quais o isolado foi resistente. Sendo que AMC-amoxicilina + ácido clavulânico; AMO-amoxicilina; AMP-ampicilina; ASB-ampicilina + sulbactam; ATM-aztreonam; CAZ-ceftazidima; CIP-ciprofloxacina; CFL-cefalotina; CLO-cloranfenicol; CPD-cefpodoxima; CPM-cefepima; ERI-eritromicina; GEN-gentamicina; MER-meropenem; NAL-ácido nalidíxico; NIT-nitrofurantóina, TET-tetraciclina e VAN-vancomicina.

Isolado	Local de coleta	Gram	Antimicrobianos aos quais o isolado apresentou resistência
A	Lagoa 8	Negativo	ATM e CPD
B	Lagoa 6	Negativo	Nenhum
C	Lodo ativado	Negativo	CLO e TET
D	Lagoa 8	Positivo	AMP, CAZ, CPM e TET
E	Lagoa 1	Negativo	CLO e CPD
F	Lagoa 3	Negativo	ATM e CPD
G	Lagoa 8	Negativo	AMO
H	Tanque de aeração	Negativo	ATM e CPD
I	Tanque de aeração	Negativo	ATM, CAZ, CPD e NAL
J	Tanque de aeração	Positivo	AMP, CAZ, CIP, CPM, ERI e GEN
K	Caixa de entrada	Negativo	CLO e CPD
L	Tanque de aeração	Negativo	ATM, CAZ e NAL
M	Caixa de entrada	Negativo	ATM, CAZ e NAL
N	Tanque de aeração	Negativo	ATM, CAZ e NAL
O	Lagoa 1	Negativo	ATM, CAZ e NAL
P	Caixa de entrada	Negativo	CPD
Q	Tanque de aeração	Negativo	ATM e CPD
R	Caixa de entrada	Negativo	ATM, CAZ, CLO e CPD
S	Caixa de entrada	Negativo	ATM e CPD
T	Tanque de aeração	Negativo	CPD
U	Caixa de entrada	Positivo	CAZ, CPM, ERI e MER
V	Tanque de aeração	Negativo	ATM
W	Caixa de entrada	Positivo	AMC, CAZ, CIP, CPM, ERI, GEN e NIT
X	Caixa de entrada	Positivo	AMC, AMP, CIP, CFL, CLO, CPM, ERI, NIT e VAN
Y	Caixa de entrada	Negativo	AMO e CPD
Z	Tanque de aeração	Positivo	CAZ
AA	Tanque de aeração	Negativo	ATM e NAL
AB	Lagoa 1	Positivo	AMP, CFL, CLO, CPM e TET
AC	Lagoa 1	Negativo	AMO, ASB, CLO, CPD e NAL
AD	Lagoa 6	Positivo	CAZ, ERI e NIT

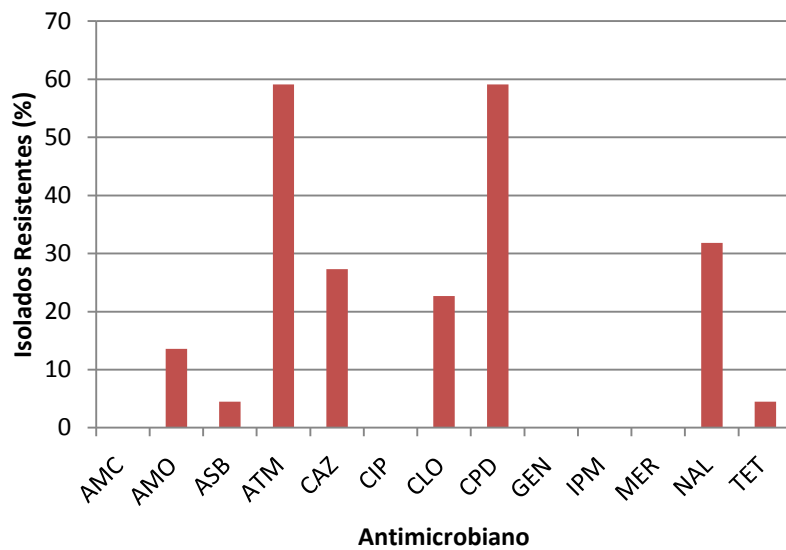


Figura 2. Perfis de resistência de isolados Gram negativos obtidos através do teste de disco difusão em ágar (n=22). Sendo que AMC-amoxicilina + ácido clavulânico; AMO-amoxicilina; ASB-ampicilina + sulbactam; ATM-aztreonam; CAZ-ceftazidima; CIP-ciprofloxacina; CLO-cloranfenicol; CPD-cefpodoxima; GEN-gentamicina; IPM-imipenem; MER-meropenem; NAL-ácido nalidíxico e TET-tetraciclina.

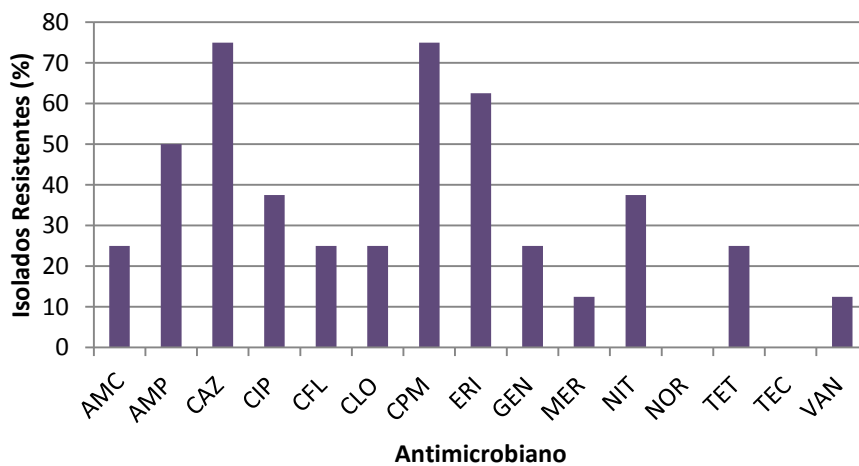


Figura 3. Perfis de resistência de isolados Gram negativos obtidos através do teste de disco difusão em ágar (n=8). Sendo que AMC-amoxicilina + ácido clavulânico; AMP-ampicilina; CAZ-ceftazidima; CIP-ciprofloxacina; CFL-cefalotina; CLO-cloranfenicol; CPM-cefepima; ERI-eritromicina; GEN-gentamicina; MER-meropenem; NIT-nitrofurantoína; NOR-norfloxacina; TET-tetraciclina; TEC-teicoplanina e VAN-vancomicina.

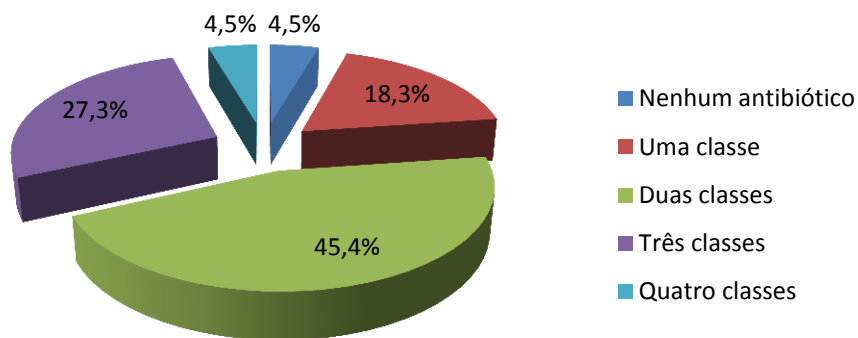


Figura 4. Frequência de resistência às classes de antimicrobianos testados nos isolados Gram negativos (n=22).

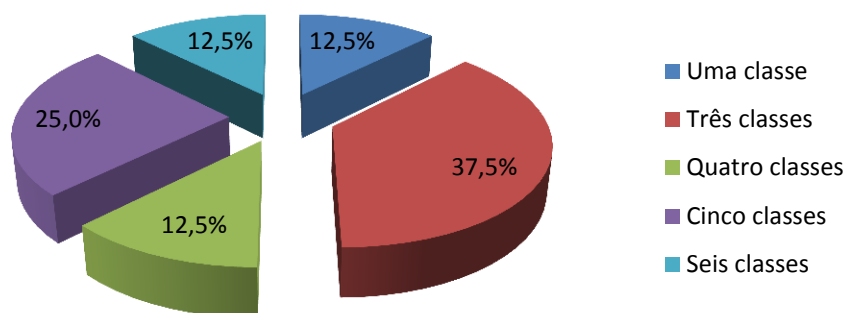


Figura 5. Frequência de resistência às classes de antimicrobianos testados nos isolados Gram positivos (n=8).

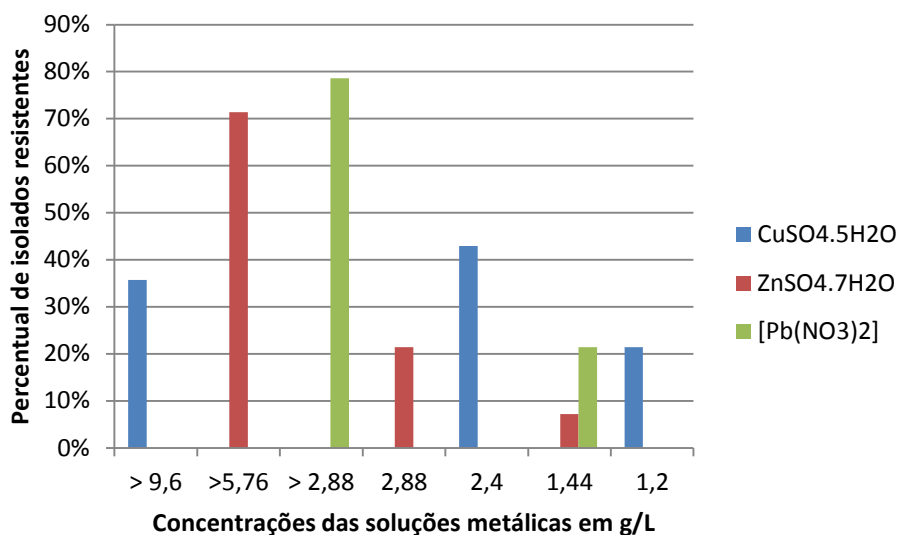


Figura 6. Resultado do teste de CIM para sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O), sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄.7H₂O) e nitrato de chumbo [Pb(NO₃)₂], em g.L⁻¹ nos 14 isolados testados.

Tabela 2. Número de isolados Gram negativos e Gram positivos resistentes para cada classe de antimicrobianos.

Classes	Antimicrobiano	Isolados Gram negativos resistentes	Isolados Gram positivos resistentes	
β-Lactâmicos	Amoxicilina	3	---	
	Penicilinas	Amoxicilina + Ácido Clavulânico	0	2
		Ampicilina	---	4
		Ampicilina + Sulbactam	1	---
		Cefalotina	---	2
	Cefalosporinas	Cefepima	---	6
		Cefpodoxima	13	---
		Ceftazidima	6	6
	Monobactâmicos	Aztreonam	13	---
	Carbapenêmicos	Imipenem	0	---
		Meropenem	0	1
	Glicopeptídeos	Teicoplanina	---	0
		Vancomicina	---	1
	Aminoglicosídeos	Gentamicina	0	2
	Macrolídeos	Eritromicina	---	5
	Tetraciclina	Tetraciclina	0	2
Quinolonas	Ácido Nalidíxico	7	---	
	Ciprofloxacina	0	3	
	Nitrofurantoína	---	3	
	Norfloxacina	---	0	
Anfenicóis	Cloranfenicol	5	2	

Tabela 3. Perfil de resistência a antimicrobianos e a metais pesados dos 14 isolados multirresistentes.

Isolado	N° de classes de antimicrobianos aos quais foi resistente	MIC CuSO₄.5H₂O (g/L⁻¹)	MIC ZnSO₄.7H₂O (g/L⁻¹)	MIC [Pb(NO₃)₂] (g/L⁻¹)
X	6	> 9,6	> 5,76	> 2,88
W	5	> 9,6	> 5,76	> 2,88
J	5	2,4	> 5,76	> 2,88
AB	4	> 9,6	> 5,76	> 2,88
AC	4	2,4	1,44	1,44
D	3	> 9,6	> 5,76	> 2,88
I	3	> 9,6	> 5,76	> 2,88
M	3	2,4	> 5,76	> 2,88
U	3	2,4	> 5,76	> 2,88
AD	3	2,4	> 5,76	> 2,88
L	3	2,4	2,88	> 2,88
N	3	1,2	2,88	> 2,88
R	3	1,2	> 5,76	1,44
O	3	1,2	2,88	1,44