

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

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE EM BASTONETES GRAM NEGATIVOS NÃO  
FERMENTADORES ISOLADOS DE AMOSTRA DE ÁGUA SUPERFICIAL  
SUBMETIDA A TRATAMENTO COM ANTIMICROBIANO

MAGDA ANTUNES DE CHAVES

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gertrudes Corção

Porto Alegre  
MARÇO, 2017

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

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE EM BASTONETES GRAM NEGATIVOS NÃO  
FERMENTADORES ISOLADOS DE AMOSTRA DE ÁGUA SUPERFICIAL  
SUBMETIDA A TRATAMENTO COM ANTIMICROBIANO

Magda Antunes de Chaves  
Bióloga - UFSM

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Gertrudes Corção

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil  
Março, 2017

Antunes de Chaves, Magda

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE EM BASTONETES GRAM  
NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES ISOLADOS DE AMOSTRA DE  
ÁGUA SUPERFICIAL SUBMETIDA A TRATAMENTO COM  
ANTIMICROBIANO / Magda Antunes de Chaves. -- 2017.

86 f.

Orientador: Gertrudes Corção.

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, 2017.

1. Resistência a antimicrobianos. 2. Pseudomonas  
sp.. 3. Acinetobacter sp.. 4. Reservatório de genes  
de resistência. 5. Ambiente Aquático. I. Corção,  
Gertrudes, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Deus da Bíblia, o meu Deus, pelo amparo nos momentos de dificuldade. Construir uma dissertação não é tarefa fácil.

A minha família, em especial minha mãe Lúcia e meu irmão Márcio, também não poderia deixar de mencionar minha filha Isabeli, que mesmo tão pequena, sempre se mostrou muito compreensiva. Amo muito vocês e agradeço a Deus pela família que me deu.

A minha professora e orientadora Dra. Gertrudes Corção, muito obrigada pela oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação, pela sua disponibilidade e paciência, pelo aprendizado, mas acima de tudo, obrigada pelas vezes que me ouviu e aconselhou. Tenha certeza que todas as suas palavras foram essenciais para o meu crescimento.

Aos professores do PPGMAA que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos e colegas de laboratório Athos Tópor, Belize Leite, Karine Meneghetti, Letícia Otton, Micaela Canabarro, Natália Canal e Thaís Hain. Muito obrigada pelo carinho, ajuda e amizade que construímos nesses anos de convívio.

A Terimar Ruoso Moresco, minha professora de Microbiologia na graduação, muito obrigada por me apresentar o fascinante mundo da Microbiologia.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE EM BASTONETES GRAM NEGATIVOS NÃO  
FERMENTADORES ISOLADOS DE AMOSTRA DE ÁGUA SUPERFICIAL  
SUBMETIDA A TRATAMENTO COM ANTIMICROBIANO

Autora: Magda Antunes de Chaves

Orientadora: Dra. Gertrudes Corção

RESUMO

Bactérias Gram-negativas não fermentadoras são frequentemente encontradas em águas superficiais, sendo muitas vezes carregadoras de múltipla resistência. O presente trabalho teve como objetivo principal analisar a participação de *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. na manutenção da resistência a antimicrobianos em quatro pontos na laguna de Tramandaí e se a presença deles poderia contribuir para a sua permanência. As amostras de água superficial foram coletadas em quatro pontos de coleta na laguna e submetidas a tratamento com os antimicrobianos: ácido nalidíxico, ceftazidima, imipenem e tetraciclina na concentração de 20mg/L. Em cada ponto de coleta uma das alíquotas não foi suplementada com os mesmos sendo utilizada como controle. Os isolados de *Pseudomonas* sp. foram identificados por provas bioquímicas e MALDI-TOF MS, enquanto que os isolados de *Acinetobacter* sp. somente por provas bioquímicas. O perfil de suscetibilidade de ambos foi avaliado pela técnica de disco-difusão e a produção de ESBL pela técnica de disco combinado. Os pontos 3 e 4 foram os que exibiram maior número de isolados resistentes. Os maiores percentuais de resistência estiveram associados às amostras submetidas ao tratamento com antimicrobianos. Em todos os pontos de coleta foram encontrados isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp. multirresistentes. Ambas amostras (com e sem tratamento) exibiram diferentes padrões de resistência nos diferentes pontos de coleta e tanto isolados de *P. aeruginosa* como de *Acinetobacter* sp. exibiram isolados produtores de ESBL. A presença de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp. multirresistentes na Laguna de Tramandaí atenta para o risco de disseminação de resistência neste ambiente e que o mesmo pode estar atuando como reservatório de resistência.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (86p.) Março, 2017.

# SUSCEPTIBILITY PROFILE IN GRAM NEGATIVE NON-FERMENTERS RODS ISOLATED FROM SURFACE WATER SAMPLES SUBMITTED TO ANTIMICROBIAL TREATMENT

Author: Magda Antunes de Chaves

Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gertrudes Corção

## ABSTRACT

Non-fermenting Gram-negative bacteria are often found in surface water, and are often carriers of multiple resistance to antimicrobials. The present work had as main objective to analyze the role of *Pseudomonas* sp. and *Acinetobacter* sp. in maintaining antimicrobial resistance at four points in the Tramandaí lagoon. The surface water samples were collected at four sampling points in the lagoon and treated with the antimicrobials: nalidixic acid, ceftazidime, imipenem and tetracycline at a concentration of 20mg/L. At each collection point, one of the aliquots was not supplemented with the antimicrobial and were used as the control for the treatment. The isolates of *Pseudomonas* sp. were identified by biochemical tests and MALDI-TOF MS, whereas the isolates of *Acinetobacter* sp. were identified only by biochemical tests. The susceptibility profile of both was evaluated by the disc diffusion method and the ESBL production by the combined disk method. Sampling points 3 and 4 showed the highest number of resistant isolates. The highest percentages of resistance were associated with the samples that were submitted to antimicrobial treatment. In all sampling points, multiresistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* were isolated. Both samples (with and without treatment) showed different resistance patterns within the sampling points. *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. isolates exhibited ESBL producers. The presence of multiresistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. in the Tramandaí Lagoon attempted to the risk of spreading resistance in the aquatic environment, since it can act as a reservoir of resistance.

---

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (86p.)  
March, 2017.

## SUMÁRIO

2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
2.2.1 Objetivo específico	3
2.2.2 Objetivo específico	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Características gerais de <i>Acinetobacter</i> sp.	4
3.2 Características gerais de <i>Pseudomonas</i> sp.	6
3.3 Resistência a antimicrobianos e o ambiente aquático	8
3.4 $\beta$ -lactâmicos e mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos em <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Acinetobacter</i> sp.	13
3.5 Tetraciclinas e mecanismos de resistência em <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Acinetobacter</i> sp.	16
3.7 Identificação molecular de <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Acinetobacter</i> sp.	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Meios de Cultura e Soluções	21
4.2 Descrição da área de estudo e coleta das amostras	21
4.3 Isolamento de bactérias heterotróficas na água	24
4.4 Triagem e Identificação bioquímica de <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Acinetobacter</i> sp.	24
4.5 Identificação bacteriana por MALDI – TOF MS.	25
4.6 Análise da susceptibilidade a antimicrobianos	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1 Crescimento de <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Acinetobacter</i> sp. em meio de cultura suplementado com antimicrobianos de acordo com o ponto de coleta	28
5.2 Perfil de resistência entre os isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> sp.	36
5.3 Detecção de produção de ESBL	54
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8. ANEXOS	74
8.1 Meios de Cultura	74
8.2 Soluções	76

## RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1: Antimicrobianos utilizados para análise do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Acinetobacter</i> sp.....	26
TABELA 2: Número de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> obtidos de amostras de água da Laguna de Tramandaí suplementadas ou não com antimicrobianos segundo os pontos de coleta.....	29
TABELA 3: Número de <i>Acinetobacter</i> sp. obtidos de amostras de água da Laguna de Tramandaí suplementadas ou não com antimicrobianos segundo os pontos de coleta.....	29
TABELA 4: Percentual de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes e multirresistentes de amostras de água superficial submetidas ou não a tratamento com antimicrobianos, segundo os pontos de coleta da Laguna de Tramandaí/RS.....	37
TABELA 5: Perfil de multirresistência a antimicrobianos em isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> obtidas de amostras de água superficial com e sem tratamento com antimicrobianos.....	44
TABELA 6: Percentual de <i>Acinetobacter</i> sp. resistentes e multirresistentes de amostras de água superficial submetidas ou não a tratamento com antimicrobianos, segundo os pontos de coleta da Laguna de Tramandaí/RS.....	48
TABELA 7: Perfil de multirresistência a antimicrobianos em isolados de <i>Acinetobacter</i> sp. obtidos de amostras de água superficial com e sem tratamento com antimicrobianos.....	53



## RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1: Localização dos pontos de coleta da Laguna de Tramandaí. Ponto 1: foz do estuário. Ponto 2: trapiche de um condomínio horizontal de Imbé, ponto interno da laguna. Ponto 3: meio da laguna. Ponto 4: margem da laguna com urbanização ausente e salinidade reduzida.....	23
FIGURA 2: Comparação entre o número de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com e sem o tratamento com os antimicrobianos de acordo com o ponto de coleta.....	34
FIGURA 3: Comparação entre o número de <i>Acinetobacter</i> sp. com e sem o tratamento com os antimicrobianos de acordo com o ponto de coleta.....	35
FIGURA 4: Percentual de resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> quando submetidos ao teste de disco difusão .....	40
FIGURA 5: Percentual de resistência de <i>Acinetobacter</i> sp. quando submetidos ao teste de disco difusão.....	50

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical laboratory standards institute
CPM	Cefepima
CTX	Cefotaxima
ESBL	B-lactamase de espectro estendido
FOX	Cefoxitina
GEN	Gentamicina
I	Intermediário
IPM	Imipenem
KOH	Hidróxido de sódio
MDR	Multirresistente
NOR	Norfloxacina
O/F	Oxidação/fermentação
pH	Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons de hidrogênio em solução
PCA	Ágar contagem padrão
PPT	piperacilina-tazobactam
R	Resistente
S	Sensível
SUT	sulfametoxazol-trimetoprima
TET	Tetraciclina
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSI	Ágar Triplice Açucar

## 1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são moléculas essenciais para o tratamento de doenças infecciosas ocasionadas por bactérias. E, desde que foram descobertos, microrganismos resistentes surgem logo após um antimicrobiano ser introduzido, o que tem gerado preocupação mundial, uma vez que essas moléculas são extremamente necessárias para combater doenças bacterianas. Os  $\beta$ -lactâmicos, assim como as tetraciclínas e quinolonas são comumente utilizados para esses fins. Logo, microrganismos resistentes a eles têm sido encontrados nos mais diversos locais.

Quando administrados em humanos e animais essas substâncias não são totalmente metabolizadas pelo organismo, sendo excretadas diretamente no ambiente ou então em estações de tratamento de águas residuais, onde não são totalmente removidas e posteriormente são liberadas em corpos de águas. E, isso representa um problema sério, porque uma vez que essas moléculas estão presentes em baixas concentrações no ambiente aquático, este, age como um biorreator e favorece a aquisição de determinantes de resistência entre as bactérias, pois nele, além de serem descarregados resíduos de antimicrobianos também são descarregados metais pesados, desinfetantes, produtos farmacêuticos, esgotos, entre outros.

A água é um dos recursos naturais essenciais para a manutenção da vida na terra e a contaminação desse recurso representa um perigo tanto para os seres que habitam nesses locais, quanto para os humanos e os animais. Considerada um dos habitats bacterianos mais importantes, abriga uma variedade de microrganismos que podem ser indígenas do local ou então exógenos oriundos de outros locais, vindos através de correntes de águas superficiais tais como os rios. Uma vez que esses ambientes possuem uma diversidade enorme de microrganismos, alguns podem ser patogênicos, como é o caso de algumas espécies dos gêneros *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp., que são microrganismos gram-negativos, não fermentadores de lactose, frequentemente encontrados em ambientes aquáticos e que muitas vezes apresentam multirresistência a diversas classes de antimicrobianos. Estas bactérias podem contribuir para a troca de material genético e também adquirir novos mecanismos de resistência, e se por acaso esses microrganismos retornarem a população através do ciclo urbano da água, podem

ocasionar doenças que talvez não consigam ser combatidas através do uso de antimicrobianos.

A Laguna de Tramandaí é um estuário localizado no litoral norte do Rio Grande do Sul, entre os municípios de Imbé e Tramandaí que recebe o aporte de águas de diversos rios da região e também do oceano. O interesse em estudar a água da Laguna deve-se ao fato de ser um ecossistema transitório entre águas fluviais e oceânicas, o que favorece a movimentação de microrganismos de um ambiente para o outro. Além disso, em época de veraneio a busca por lazer tem aumentado a concentração de pessoas nesses municípios, o que tem colocado em evidência a contaminação da laguna por esgotos domésticos, já que menos da metade do município de Tramandaí tem coleta e tratamento de esgotos e Imbé não possui rede de coleta ou tratamento de esgotos, sendo o sistema de fossas sépticas utilizado pela população.

Como dito anteriormente, os antimicrobianos não são totalmente degradados quando entram no ambiente aquático, ainda que passem por processos de tratamento em estações de tratamento de águas residuais. Desta maneira o objetivo do presente estudo foi verificar, através de uma simulação *in vitro* com antimicrobianos, se microrganismos resistentes (*Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp.) estão presentes nesse local e se a presença de antimicrobianos poderia contribuir para a permanência de cepas resistentes nesse ambiente.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar a participação de bactérias Gram-negativas não fermentadoras na manutenção da resistência a antimicrobianos em pontos na Laguna de Tramandaí que apresentam diferentes níveis de antropização e verificar através de uma simulação *in vitro* se a presença de antimicrobianos poderia contribuir para a permanência de isolados bacterianos resistentes no local.

### **2.2 Objetivos Específicos**

#### **2.2.1 Objetivo específico 1**

Isolar e identificar bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* a partir de amostras de água da Laguna de Tramandaí submetidas ou não a antimicrobianos.

#### **2.2.2 Objetivo específico 2**

Caracterizar os isolados de *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. de acordo com os perfis de suscetibilidade a diferentes classes de antimicrobianos e quanto a produção de beta lactamases de espectro estendido.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Características gerais de *Acinetobacter* sp.

A palavra *Acinetobacter* é derivada do grego “akinetos” que significa incapaz de se mover (DOUGHARI, et al., 2011). *Acinetobacter* foi descrito pela primeira vez em 1911 por Martinus Willem Beijerinck. Microbiologista holandês isolou a primeira cepa de *Acinetobacter* do solo e a identificou como *Micrococcus calcoaceticus* (NEMEC et al., 2009, CAMP & TATUM, 2010). Ao longo das décadas, *Acinetobacter* foi incluído em diferentes gêneros e após extensas revisões taxonômicas, em 1957 Brisou e Prevot sugeriram o gênero *Acinetobacter* (BÉRÉZIN & TOWNER, 1996). Em 1974 o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* descreveu o gênero com uma única espécie *Acinetobacter calcoaceticus* (PELEG et al., 2008). Atualmente, o gênero está incluído dentro do reino Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Pseudomonadales, família Moraxellaceae (PELEG et al., 2008). Constituído por 51 espécies que podem ser isoladas do solo, água, alimentos, além da microbiota de humanos e animais (ATROUNI et al., 2016).

O gênero apresenta a forma de cocobacilos gram-negativos, não esporulados, imóveis, com tamanho variando de 1 a 1,5 µm de comprimento por 1,5 a 2,5 µm de diâmetro. Quando corados com coloração de Gram, apresentam dificuldade na etapa de descoloração, pois tendem a reter o cristal violeta, o que pode levar a identificação errônea destes microrganismos, podendo comportar-se como cocos gram-positivos (DOUGHARI et al., 2011). Não fermentam glicose, são estritamente aeróbios, classificados como catalase positiva, oxidase negativa, indol negativo, não produzem pigmentos e seu DNA exibe cerca de 39 a 47% moles de conteúdo GC. Utilizam amônia e nitrato como fonte de nitrogênio e a maioria das cepas não reduzem nitrato a nitrito pelo ensaio de redução de nitrato convencional (BAUMANN, 1968; BÉRÉZIN & TOWNER, 1996). São incapazes de utilizar metanol, glicerol, açúcares, dissacarídeos ou polissacarídeos, com raras exceções, são impossibilitados de crescer em ambientes com D-glicose ou glucanato como fonte de carbono. Muitas cepas são produtoras de lipases e poucas hidrolisam gelatina (BAUMANN et al., 1968).

A temperatura ótima de crescimento varia entre 34 a 35°C, porém, quando isolados de ambientes aquáticos são psicrófilos, podendo crescer em temperaturas de 4 a 30°C. Podem ser cultivados em ágar nutriente e ágar triptona de soja, onde as colônias geralmente são mucoides com coloração entre amarelo-pálido e branco-acinzentado (BÉRÉZIN & TOWNER, 1996). Também exibem bom crescimento em ágar MacConkey, ágar sangue e ágar eosina azul de metileno (EMB) no qual as colônias são azuis ou cinza azuladas (BAUMANN et al., 1968).

Em 1987 Bouvet e Grimont descreveram um sistema com 28 testes fenotípicos e constataram que, embora os testes fossem úteis para estudos epidemiológicos, eram trabalhosos e não identificavam de forma eficiente algumas espécies do gênero (BOUVET & GRIMONT, 1987), isso porque algumas espécies contém similaridades fenotípicas (BUYLLA et al., 2012), dificultando a sua identificação (DOUGHARI, et al., 2011). Como é o caso do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (Acb) cujo nome é dado devido a dificuldade de distinção fenotípica e genotípica entre as espécies formadoras do complexo (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*) (TEIXEIRA, 2013).

Devido a falta de metodologias rápidas e de fácil praticidade, a epidemiologia e ecologia das espécies que compõem o gênero não são bem compreendidas (BOUVET & GRIMONT, 1987). Para tanto, métodos moleculares têm sido utilizados para identificar *Acinetobacter* ao nível de espécie, uma vez que podem fornecer melhores percepções sobre a diversidade de populações de *Acinetobacter* em habitats ambientais (BUYLLA, et al., 2012).

O sequenciamento do gene *16S rRNA*, assim como o da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (*rpoB*), subunidade  $\beta$  (*gyrB*) da DNA gyrase, e a hidridização de DNA-DNA tem se mostrado eficientes para a caracterização molecular desse gênero (KHOSRAVI et al., 2015). A espectrometria de massa, como é o caso do MALDI-TOF (*Matrix - Assisted Laser Desorption - Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) também pode ser utilizado para a identificação *Acinetobacter* sp. (TOH et al., 2015).

De natureza ubíqua (PELEG et al., 2008) o habitat desses micro-organismos pode variar de acordo com a espécie (MARAVIC et al., 2016), como é o caso de *A. schindleri* e *A. ursingii* frequentemente encontrados na pele de humanos, ou de *A. calcoaceticus* comumente encontrado no solo (PELEG et al., 2008), além de *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. parvus* e *A. tjernbergiae* que são encontrados em

estações de tratamento de água e água de torneira, *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. townneri* e *A. tandoii* são encontrados em lodo ativado (XIN et al., 2014).

Em humanos *Acinetobacter* pode ser comensal da pele e do trato respiratório (SHAKIBAIE et al., 2012) ou oportunista causador de infecções hospitalares (TRIPATHI et al., 2014; SHAKIBAIE et al., 2012) que variam desde pneumonia, endocardites, infecções no trato urinário, meningite a septicemia (SHAKIBAIE et al., 2012), sendo que a via respiratória inferior e o trato urinário são os principais locais de infecção (TOWNER, 1997).

*Acinetobacter baumannii* é a espécie com maior relevância clínica, pois é considerado um problema em instituições de saúde devido a dificuldade de erradicação, uma vez que apresenta resistência a dessecação, sanitizadores químicos e luz ultravioleta, além de ter alta tendência a adquirir resistência a antimicrobianos (CARVALHO et al., 2016). Embora seja o principal causador de infecções nosocomiais ao nível de gênero, outras espécies também estão relacionadas com essas infecções, tais como: *A. nosocomialis*, *A. pittii* e menos frequente *A. ursingii*, *A. haemolyticus*, *A. lwoffii*, *A. parvus* e *A. junii* (TOUCH et al., 2014).

No ambiente aquático, pode ser isolado de rios, lagos, oceanos (ROCHA et al., 2013; XIN et al., 2014), esgotos, entre outros (GUARDABASSI et al., 1999). Nesses ambientes pode sofrer pressão seletiva o que pode levar a aquisição de resistência a antimicrobianos (ZHANG, 2009; ROCHA et al., 2013). Sendo assim, o habitat aquático representa uma importante fonte de *Acinetobacter* com potencial para infectar humanos (ROCHA et al., 2013; XIN et al., 2014).

### **3.2 Características gerais de *Pseudomonas* sp.**

O gênero *Pseudomonas* foi descrito pela primeira vez em 1894 por Walter Emil Friedrich August Migula, botânico devotado ao estudo de taxonomia de plantas (PEIX, et al., 2009), descreveu “células com órgãos polares de motilidade” que mais tarde chamou de *Pseudomonas pyocynea*, sendo renomeada futuramente como *Pseudomonas aeruginosa* (PALLERONI, 2010). O nome *Pseudomonas* refere-se a *pseudo* “falso” e *mona*: “única unidade” (PALLERONI et al., 2010).



Atualmente o gênero é composto por mais de 144 espécies (GOMILA et al., 2014), incluídas dentro do reino Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Pseudomonadales, família *Pseudomonadaceae* (PALLERONI, 1984). É constituído por microrganismos gram-negativos cujas células são únicas, retas ou ligeiramente curvas, mas não helicoidais (STANIER et al., 1966) com cerca de 0,5 - 1,0 µm de diâmetro e de 1,5 – 5,0 µm de comprimento. São classificados como oxidase e catalase positiva, aeróbicos e toleram valores de pH relativamente altos, pois a maioria das espécies não crescem em condições ácidas (MOORE et al., 2006). No DNA apresentam entre 59-68% de conteúdo G+C (MANDEL, 1966).

Móveis, em geral possuem um ou mais flagelos polares e algumas espécies tais como *P. stutzeri* e *P. mendocina* sob certas condições de crescimento, produzem flagelos laterais (PALLERONI & DOUDOROFF, 1972). Raramente não móveis (MOORE et al., 2006), como é o caso de *P. mallei*, incluído dentro do gênero devido a relação fenotípica e filogenética com as espécies flageladas. Não produzem esporos e algumas espécies produzem pigmentos que se difundem no meio ou permanecem associados as células. *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, assim como *P. caryophylli* são exemplos de microrganismos produtores de pigmentos difusíveis (PALLERONI & DOUDOROFF, 1972).

O gênero produz lipases e proteases extracelulares e não produz indol a partir do triptofano. É capaz de metabolizar vários compostos naturais e sintéticos tais como hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos no qual sua capacidade metabólica é determinada por agrupamentos de genes que codificam enzimas catabólicas (PALLERONI et al., 2010). Para o crescimento utiliza uma ampla variedade de nutrientes, favorecendo-se em meios ricos, tais como caldo nutriente, ágar tripton de soja, ágar sangue desfibrinado de carneiro (MOORE et al., 2006), também desempenha bom crescimento em meio seletivos, como é o caso de ágar MacConkey, ágar cetrimide, além de ágar *Pseudomonas* (PALLERONI, et al., 2010). Diante da versatilidade metabólica do gênero, nenhum mineral específico ou vitamina são necessários para o crescimento de espécies de *Pseudomonas*. É capaz de crescer em temperaturas entre 4 a 41°C (MOORE et al., 2006).

Diversas ferramentas moleculares têm sido utilizadas para a identificação do gênero, tais como, sequenciamento do 16S *rRNA*, gene do fator sigma da RNA

polimerase (*rpoD*), *gyrB* (YAMAMOTO et al., 2000; CALDERA et al., 2016), bem como espectrometria de massas (HRABÁK et al., 2013) como é o caso do MALDI-TOF, que também pode ser utilizado para a identificação até o nível de espécie (HRABÁK et al., 2013).

Devido ao seu caráter fototrófico, versatilidade metabólica, plasticidade do genoma, além de adaptabilidade para lidar com diferentes formas de estresse, sejam eles físicos, químicos ou componentes antibacterianos, o gênero pode ser encontrado na maioria dos ambientes, já que essas características são a força motora para a sua ampla adaptabilidade (VAZ-MOREIRA et al., 2012). É um dos grupos bastante estudado, uma vez que tem várias espécies patogênicas para plantas, humanos ou animais (VAZ-MOREIRA et al., 2012). Como é o caso de *P. aeruginosa* patógena de humanos, *P. baetica* e *P. anguilliseptica* causadores de doenças em animais ou *P. syringae* considerado um microrganismo patogênico de plantas (MULET et al., 2012).

Desta forma, o gênero constitui um dos grupos mais diversos de bactérias ecologicamente significantes no planeta, ocupando uma importante posição no ciclo do carbono e nitrogênio (VAZ-MOREIRA et al., 2012). O poder de colonizar diferentes nichos ecológicos está relacionado a capacidade de sintetizar diversos fatores de virulência, tais como alginato, pili e lipopolissacarídeos (IGBINOSA & IGBINOSA, 2015).

A ecologia de *Pseudomonas* sp. na biosfera tem sido um assunto de grande interesse, uma vez que são frequentemente resistentes a antimicrobianos, desinfetantes, metais pesados, detergentes e solventes orgânicos (PEIX, 2009), pois apresenta fatores de resistência intrínsecos e extrínsecos, resultantes de alterações fisiológicas ou estruturais podendo ou não ser genéticos (VAZ-MOREIRA, 2012). Em ambientes aquáticos, pode disseminar genes de resistência a antimicrobianos através de elementos genéticos móveis difundindo-se por meio de populações bacterianas da água (ULLAH et al., 2012).

### **3.3 Resistência a antimicrobianos e o ambiente aquático**

Desde a descoberta dos antimicrobianos, eles têm sido amplamente usados no combate a doenças infecciosas de origem bacteriana (WRIGHT, 2010).

No entanto, com o passar dos anos microrganismos resistentes foram sendo encontrados, o que colocou em dúvida a eficácia dessas moléculas ao longo do tempo (GALÁN et al., 2013). Hoje em dia, a resistência bacteriana representa um problema de saúde pública, já que os microrganismos estão se tornando resistentes aos mais diversos agentes antimicrobianos, o que tem ocasionado doenças prolongadas e maior risco de morte (WHO, 2014).

Acredita-se que a resistência não é um fenômeno ou algo novo, e sim algo natural evolutivamente conservado ao longo dos anos (WRIGHT, 2010) e que se originou em organismos produtores de antimicrobianos para protegê-los de seus próprios produtos e evoluir em outros organismos originalmente susceptíveis que vivem próximos dos produtores, por exemplo, no solo. Em resumo, os determinantes de resistência estão presentes na natureza e têm o potencial de serem transferidos horizontalmente para patógenos humanos (AL-BAHRY et al., 2014).

Os principais mecanismos de proteção que levam as bactérias à aquisição de resistência a antimicrobianos são a transferência horizontal de genes e a mutação (LAXMINARAYAN et al. 2013). Ainda que as mutações sejam a causa primária de resistência, a aquisição de determinantes de resistência através de transferência horizontal de genes exibe o papel principal na disseminação de resistência entre as bactérias e esta, ocorre por vários processos tais como: conjugação, transdução, transformação e transposição (VITTECOQ et al., 2016). A transferência horizontal de genes pode aumentar a resistência a antimicrobianos e ainda a multirresistência, devido aos plasmídeos que podem conter cassetes de resistência múltipla (BREIDENSTEIN et al., 2011).

Além dos determinantes de resistência adquiridos pelas bactérias, estudos dizem que aproximadamente 3% do genoma bacteriano pode estar relacionado a processos de resistência intrínseca, que pode ser descrita como um conjunto de genes não-adquiridos com capacidade de influenciar na suscetibilidade aos antimicrobianos (FAJARDO & MARTÍNEZ, 2008). Esse tipo de resistência representa uma característica fenotípica de uma espécie, resultante de genes que não são facilmente transferíveis por transferência horizontal de genes (VAZ-MOREIRA et al., 2014), e compreende diversos mecanismos, que podem ser relacionados com propriedades bioquímicas, fisiológicas e estruturais da bactéria,

tais como: redução da permeabilidade, funções metabólicas, sistemas de efluxo, entre outros.

Um bom exemplo de bactéria que exibe resistência intrínseca é *P. aeruginosa*, intrinsecamente resistente ao ácido nalidíxico, onde sua membrana age como uma barreira seletiva a absorção de alguns antimicrobianos devido ao tamanho destes (BREIDENSTEIN et al., 2014). *Acinetobacter baumannii* também é intrinsecamente resistente a alguns antimicrobianos, expressando a mesma característica que *P. aeruginosa*, além de expressão de algumas bombas de efluxo (NEONAKIS et al., 2011). Logo, uma população bacteriana intrinsecamente resistente, terá maiores chances de sobreviver na presença de resíduos de antimicrobianos (BREIDENSTEIN et al., 2011).

Bactérias resistentes, assim como resíduos de antimicrobianos, são frequentemente encontrados em ambientes aquáticos e a contaminação desses ambientes ocorre principalmente por meio de estações de tratamento de águas residuais (RODRIGUES-MOZAZ et al., 2015). As estações de tratamento de águas residuais proporcionam as condições ideais para o estabelecimento e propagação de bactérias resistentes, pois, nesses locais estão presentes, altas densidades bacterianas junto a concentrações elevadas de nutrientes e oxigênio (RIZZO et al., 2013), também produtos farmacêuticos e metais pesados (NOVO et al., 2013; MARTINS et al., 2014; MANAIA et al., 2016), que misturam-se e com isso inúmeras transformações químicas e biológicas acontecem, contribuindo para a evolução e liberação de microrganismos resistentes em ecossistemas aquáticos (BAQUERO et al., 2008).

Estudos afirmam que apesar das estações de tratamento de águas residuais executarem procedimentos necessários para retirar seus poluentes, eles não são totalmente removidos (RODRIGUES-MOZAZ et al., 2015). Apenas alguns compostos são parcialmente biodegradados e se presentes nesses locais, estes podem tornar-se importantes fontes para a seleção de bactérias resistentes (KUMERER, 2003). Por esse motivo, nos últimos anos, os antimicrobianos têm sido monitorados em estações de tratamento de águas residuais e em rios receptores, uma vez que podem ser encontrados na ordem de microgramas por litro nesses ambientes (RODRIGUES-MOZAZ et al., 2015). A concentração de antimicrobianos em um rio receptor de águas residuais e de uma estação de tratamento de águas

que recebia esgoto hospitalar e urbano foi avaliada com o objetivo de analisar a remoção dessas moléculas durante o tratamento na estação e a possível presença delas no rio receptor. Os resultados indicaram que a estação de tratamento foi incapaz de remover totalmente essas moléculas, pois concentrações elevadas de antimicrobianos foram detectadas nas amostras analisadas (RODRIGUES-MOZAZ et al., 2015).

Xu et al. (2015) afirmam que antimicrobianos têm sido detectados em ambientes aquáticos, mesmo em concentrações relativamente baixas, persistindo nesses locais durante meses a anos. Um exemplo são as quinolonas, moléculas extremamente estáveis, cuja presença em ambientes aquáticos produzem efeitos dramáticos sobre as populações bacterianas (ALONSO et al., 2001). As tetraciclinas também são frequentemente encontradas no ambiente aquático (HARNISZ et al., 2015). Estudos dizem que até 40% da população bacteriana, obtidas de resíduos municipais e efluentes são resistentes a tetraciclina (HARNISZ et al., 2011). Logo, a presença de antimicrobianos em um ambiente é a principal força motriz para a seleção e propagação de resistência (NOVO et al., 2013).

Se essas moléculas não são totalmente removidas de estações de tratamento de águas residuais (KUMERER, 2003), bactérias resistentes a antimicrobianos também não. Estima-se que aproximadamente 99% podem ser eliminadas de efluentes tratados (HARNISZ et al., 2013) e o restante é liberado com resíduos de antimicrobianos em águas superficiais (MANAIA et al., 2016). Em geral, é possível supor alguns fatores que influenciam no destino das bactérias resistentes aos antimicrobianos durante o tratamento de águas residuais, tais como: condições abióticas, composição e estrutura da comunidade bacteriana e a presença de possíveis fatores de pressão seletiva, tais como antimicrobianos e demais poluentes. Entre as condições abióticas, fatores como a carga de matéria orgânica, a temperatura ou o fluxo de água seriam consideradas hipóteses mais relevantes (NOVO et al., 2013).

Qualquer que seja a fonte de contaminação aquática, ela geralmente aumenta em áreas de atividade humana, pois cada vez mais, corpos de água são utilizados como receptáculos para efluentes urbanos, devido ao crescimento da população (MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002). Os rios representam o principal caminho de materiais degradados oriundos de efluentes urbanos para os estuários

(ALVAREZ-VAZQUEZ et al., 2016). A contaminação de estuários com efluentes não tratados causam sérios danos ambientais, tais como: aumento da biomassa de algas, redução de oxigênio dissolvido, proliferação de algas prejudiciais, mortalidade de peixes (CAREY & MIGLIACCIO, 2009), também pode ocasionar modificações na temperatura e pH (HARNISZ, 2013), além disso, níveis elevados de nitrogênio, fósforo e carbono são descarregados nesses locais, ocasionando eutrofização (CAREY & MIGLIACCIO, 2009).

Condições ambientais são uma força motriz importante que influenciam na propagação de resistência a antimicrobianos. Em um estudo, os autores observaram que a temperatura máxima foi positivamente relacionada com a resistência ao sulfametoxazol e nos períodos de primavera (com temperaturas mais altas) a resistência foi mais prevalente do que no outono, os autores ainda relatam que a influência das condições climáticas sobre a manutenção ou proliferação da resistência aos antimicrobianos é uma questão que merece mais atenção, uma vez que pode estar relacionada com diferenças observadas em regiões geográficas distintas (NOVO et al., 2013).

Comunidades bacterianas nativas de águas superficiais que recebem águas poluídas sofrem mudanças quantitativas e qualitativas (HARNISZ, 2013). Acredita-se que a diversidade bacteriana em ambiente receptor, por exemplo, diminua (HARNISZ et al., 2011), uma vez que a poluição por antimicrobianos pode enriquecer a população de microrganismos intrinsecamente resistentes e reduzir a população de espécies sensíveis (MARTINEZ, 2009). Portanto, controlar os níveis de poluição de águas superficiais faz-se necessário, já que estes podem ocasionar alterações em todo ecossistema aquático (FUENTES et al., 2015). Além disso, o problema de bactérias resistentes e multirresistentes serem encontradas em corpos de água é a troca de material genético entre elas (MARTINEZ, 2009), conseqüentemente bactérias não patogênicas podem servir como reservatório de genes o que pode determinar a eficácia atual e futura dos antimicrobianos (BAQUERO et al., 2008).

Estudos afirmam que a água é um dos habitats bacterianos mais importantes na terra (VAZ-MOREIRA et al., 2014). Habitats de água doce estão entre os habitats naturais que apresentam a diversidade bacteriana mais rica (TAMAMES et al., 2010). Em um rank taxonômico de filo ou classe, em geral, as bactérias mais

predominantes nestes locais pertencem ao filo *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Os gêneros mais encontrados são *Acidovorax*, *Curvibacter*, *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Bacillus* e *Clostridium*. As bactérias pertencentes a estes grupos e outras ainda não identificadas, são provavelmente capazes de circular entre diferentes habitats aquáticos, abrangendo todo o ciclo urbano da água (VAZ-MOREIRA et al., 2014).

Sendo assim, a água é a principal rota de bactérias e tem sido reconhecida como uma significativa reserva de resistência a antimicrobianos, podendo agir como um biorreator facilitando o intercâmbio de genes de resistência entre bactérias patogênicas e não patogênicas (BAQUERO et al., 2008; RIZZO et al., 2013). Diante do exposto, estudar a presença de microrganismos resistentes e multirresistentes no ambiente aquático é extremamente necessário, uma vez que os mais diversos compartimentos podem receber bactérias resistentes oriundas desses locais (BAQUERO et al., 2008).

### **3.4 $\beta$ -lactâmicos e mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos em *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp.**

A história remonta para 1928 quando Alexander Fleming, um bacteriologista escocês, descobriu acidentalmente o fungo *Penicillium*. Fleming estudava a morfologia e virulência de *Staphylococcus* e certo dia ao examinar as placas com o microrganismo encontrou várias culturas contaminadas, descartando-as em uma substância desinfetante. No dia seguinte ao descrever seu experimento, retirou uma das placas que havia ficado acima do desinfetante e após re-examinação observou que esta, apresentava um outro microrganismo cuja presença parecia influenciar as colônias de *Staphylococcus*. A partir de sua descoberta, Fleming o nomeou de *Penicillium rubrum* (hoje conhecido como *P. notatum*), preservando-o e o cultivando (STEFFEE, 1992).

Através do cultivo, o pesquisador descreveu propriedades de crescimento, elaborou procedimentos de extração e projetou um rápido ensaio antimicrobiano, porém não ampliou seu trabalho em estudos clínicos, por não conseguir purificar penicilina suficiente para os ensaios. Anos mais tarde, em 1938,

os pesquisadores Florey e Chain chegaram ao extrato bruto da penicilina e alguns anos depois, a substância foi testada clinicamente, obtendo sucesso. Fleming, Florey e Chain dividiram o Prêmio Nobel de Medicina em 1945. A penicilina G como é conhecida, é produzida por fungos do gênero *Penicillium* e em 1942 foi o primeiro antibiótico a ser utilizado no ambiente clínico (STEFFEE, 1992).

Com o passar dos anos, derivados naturais da penicilina foram surgindo e atualmente, existem no mercado diversos análogos a essa substância. A diferença entre eles reside na cadeia lateral ligada ao anel  $\beta$ -lactâmico. Essa classe de antimicrobianos constitui o grupo de maior relevância do ponto de vista clínico e econômico, sendo subdivididos em cinco subclasses: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (KONG et al., 2009)

O alvo dos  $\beta$ -lactâmicos são as proteínas de ligação de penicilina (PBP) também conhecidas como transpeptidase (KOHANSKI et al., 2010). As PBPs são localizadas na membrana interna bacteriana, onde atuam no estágio final da síntese e remodelação do peptidoglicano da parede celular (SAUVAGE et al., 2008) e a função dos  $\beta$ -lactâmicos é inibir a síntese da parede celular bacteriana. Contudo, para que esses agentes tenham ação ativa é preciso que eles consigam penetrar na parede celular e se ligar as PBPs (TENOVER, 2006).

Para contornar os efeitos dos  $\beta$ -lactâmicos, microrganismos gram-negativos tais como *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. adquirem resistência através da ativação de bombas de efluxo, otimização da atividade de  $\beta$ -lactamases, seleção de porinas ou modificação de PBPs (LLARRULL, et al., 2010). Embora o mecanismo mais comum seja a produção de  $\beta$ -lactamases, que inativam a droga pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico (KOHANSKI et al., 2010).

Existem mais de 1000 enzimas  $\beta$ -lactamases descritas (PEREZ et al., 2007) e as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) fazem parte do grupo 2 na “Classificação de Bush” (leva em consideração as características funcionais e bioquímicas das enzimas  $\beta$ -lactamases para agrupá-las) (BUSH, 1995) e da classe A segundo a “Classificação de Ambler” (se baseia na similaridade de sequências de aminoácidos) (KONG et al., 2009).

As ESBL foram descritas pela primeira vez em 1983, quando uma ESBL codificada por plasmídeo inativou um antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico de espectro estendido na Alemanha naquele ano (CANTÓN & COQUE, 2006). Chegou a se



acreditar que elas surgiram pela substituição de aminoácidos nas famílias de enzimas Temoniera TEM e variável sulfidril SHV e devido as alterações estruturais que ocorreram dentro do sítio ativo destas enzimas, mutações modularam a atividade das  $\beta$ -lactamases aumentando sua atividade contra as cefalosporinas de terceira geração (STURENBURG & MACK, 2003). Entretanto, através de análises filogenéticas comprovou-se que essas enzimas se originaram a mais de dois milhões de anos, muito antes do uso moderno dos antimicrobianos (AMINOV & MACKIE, 2007), e acredita-se que sua origem seja associada a genes com funções fisiológicas na célula e com a pressão seletiva imposta pelo uso de antimicrobianos, elas evoluíram para ter a resistência aos medicamentos como sua função primária (SENGUPTA et al., 2013).

As ESBL foram encontradas primeiramente em membros da família *Enterobacteriaceae*, em especial *Klebsiella pneumonia* e *Escherichia coli*, hoje em dia também podem ser encontradas em *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. (DHILLON & CLARK, 2012). Essas enzimas são capazes de hidrolisar a maioria dos antimicrobianos presentes no mercado, incluindo penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactâmicos. São comumente codificadas por plasmídeos podendo ser transferidas entre diferentes espécies bacterianas (TACÃO et al., 2014). Além disso, são geralmente bloqueadas por inibidores de  $\beta$ -lactamases, tais como: clavulanato, sulbactam ou tazobactam (OLIVEIRA et al., 2009) e esta característica é utilizada como um importante teste fenotípico para verificar a produção de ESBL em bactérias (PEREZ et al., 2007).

No ambiente aquático, microrganismos produtores de ESBL são bem comuns. Tacão e colaboradores (2014) encontraram em amostras de águas de rios, 16% de *Pseudomonas* sp. produtoras de ESBL. Nasreen et al. (2015) coletaram amostras de água oriundas de uma lagoa em Bangladesh e através das análises observaram que 100% das cepas de *P. aeruginosa* expressavam ESBL. Maravic et al. (2016) encontraram em um estuário, 21,05% de *Acinetobacter* sp. produtores de ESBL. Stenstrom et al. (2016) analisaram a suscetibilidade de *Acinetobacter* spp. oriundas de amostras de água e solo e verificaram que 100% eram resistentes a penicilina G e 44% ao ceftriaxona. Quando analisaram a expressão fenotípica, 9,3% expressaram ESBL.

Moore et al. (2010) determinaram a diversidade total de bactérias resistentes a antimicrobianos em águas superficiais e encontraram resistência múltipla a seis classes distintas, no qual os  $\beta$ -lactâmicos foram os que mais exibiram diminuição da eficácia antimicrobiana, com 100% dos isolados resistentes a cefotaxima, 92% resistente a penicilina e aztreonam. Ullah et al. (2012) avaliaram a prevalência de *P. aeruginosa* resistente a antimicrobianos em água doce contaminada com esgoto doméstico e identificaram 100 cepas das quais 34% foram resistentes a ceftazidima e 3% ao imipenem.

### **3.5 Tetraciclinas e mecanismos de resistência em *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp.**

A família das tetraciclinas foi descoberta em 1948 a partir de uma amostra de solo, quando o pesquisador Benjamim Minge Duggar, obteve uma bactéria de coloração amarela que inibia o crescimento de suas estirpes bacterianas, formando grandes zonas de inibição de crescimento em ágar. Duggar chamou o composto de aureomicina devido a cor ouro da bactéria e a nomeou de *Streptomyces aureofaciens*. No mesmo ano, o composto foi utilizado no combate a infecções salvando milhares de vidas. A descoberta de Duggar alavancou estudos com microrganismos do solo e com isso uma nova família de antimicrobianos surgiu (NELSON & LEVY, 2011). O nome “tetraciclina” deve-se a essas moléculas serem caracterizadas por uma estrutura policíclica planar composta de quatro anéis de hidrocarbonetos (CHUKWUDI, 2016).

A família das tetraciclinas pode ser de origem natural ou semi-sintética (CHUKWUDI, 2016), formada por antimicrobianos de segunda e terceira geração (NELSON & LEVY, 2011), que são utilizados mundialmente em humanos, animais, na agricultura e aquicultura (MARTINS et al., 2014). O alvo celular dessa família é o ribossomo e para alcançá-lo, elas atravessam a membrana externa bacteriana através de porinas (McMURRY et al., 1991) e uma vez dentro da célula bacteriana, o antimicrobiano se liga na subunidade 30S do rRNA e impede que o aminoacil-tRNA se ligue ao complexo mRNA-ribossomo e dessa forma, o ribossomo se desestabiliza e conseqüentemente a síntese de proteínas não acontece (CHUKWUDI, 2016). Para contornar esse efeito, bactérias gram-negativas tais como: *Pseudomonas* sp. e

*Acinetobacter* sp. tem utilizado estratégias que conferem resistência as tetraciclinas, tais como: efluxo do antimicrobiano para fora da célula, modificação do local do alvo através de proteínas de proteção ribossomal, inativação enzimática e mutações no rRNA (LI et al., 2013). Acredita-se que a resistência as tetraciclinas se originou muito antes do uso dos antimicrobianos, pois estudos sugerem que genes de resistência as tetraciclinas tenham pelo menos 30.000 anos de idade (D’COSTA et al., 2011).

No ambiente aquático, as concentrações de tetraciclinas variam entre áreas e países devido aos diferentes padrões de uso delas (HARNISZ et al., 2015). Em 2011, os EUA relataram vendas e distribuição de aproximadamente 13,5 milhões de Kg de antimicrobianos, no qual a classe predominante foi a tetraciclina, com utilização anual de 5,6 milhões de Kg, utilizada principalmente na pecuária (HONG et al., 2013). Na China, é a segunda família de agente antimicrobiano mais utilizada e corresponde a 14% da quantidade total de antimicrobianos consumidos (CHENG et al., 2014). Já na Coréia, o consumo anual equivale a aproximadamente 723 toneladas por ano, enquanto que na Europa, 2500 toneladas são usadas anualmente (DAGHRIR & DROGHI, 2013).

Daghrir e Droghi (2013) encontraram em águas residuais e subterrâneas uma concentração residual de 0,4 µg/L de tetraciclina, 0,032 µg/L de oxitetraciclina e 0,096 µg/L de clortetraciclina. Enquanto Xu et al. (2015) encontraram em uma estação de tratamento na China, tetraciclina na concentração de 1,61 µg/L, o que indicou que o antimicrobiano não era totalmente removido da estação de tratamento. Em outro estudo, Li et al. (2013) em Hong Kong coletaram amostras de lodo ativado e verificaram a composição da comunidade bacteriana antes e após a exposição ao antimicrobiano tetraciclina (5mg/L e 20 mg/L). Antes da exposição ao antimicrobiano, 18 gêneros foram encontrados e após observou-se uma diminuição de 5 gêneros. As bactérias resistentes a tetraciclina foram agrupadas dentro de 13 gêneros, sendo que os mais prevalentes a 20 mg/L foram os gêneros *Microbacterium*, *Halietae* *Paracoccus*, enquanto que a 5 mg/L foram os gêneros acima citados, seguidos de *Pseudomonas* e *Alishewanella*.

Na aquicultura as tetraciclinas contribuem para o enriquecimento e transferência de microrganismos resistentes, uma vez que nessa prática é comum a utilização desses antimicrobianos para o tratamento de infecções ocasionadas em peixes. As explorações costeiras de aquicultura utilizam frequentemente um sistema

de tanque aberto, que permite a livre transferência de água das explorações para a água circundante e eventualmente para o sedimento. Portanto, os antimicrobianos introduzidos podem fazer com que a água e os sedimentos que os rodeiam se tornem reservatórios de resistência devido à pressão de seleção (MUZIASARI et al., 2016). Mundialmente, a aquicultura é dominada principalmente por alguns países asiáticos, no qual a China corresponde a cerca de 71% da produção total de produtos aquícolas. O uso de estrume animal como fertilizante de lagoas de aquicultura é uma prática comum nesse país, e esta leva à propagação de genes de resistência e bactérias resistentes as tetraciclinas, além de também alterar a composição da comunidade bacteriana nesses ambientes, uma vez que o estrume contém tetraciclinas usadas como promotores de crescimento para animais de criação (suínos e frangos) (XIONG et al., 2015). No Chile onde a aquicultura também é bem comum, Shah et al. (2014) obtiveram a partir de sedimentos marinhos em um tanque de aquicultura de salmão, 32% dos microrganismos resistentes a tetraciclina.

Ullah et al. (2012), encontraram bactérias resistentes a tetraciclina (76%) em amostras de água doce. De acordo com Zhang et al. (2011), plasmídeos, abrigados por Proteobactérias das classes Alpha, Beta e Gamma, são vetores relevantes de resistência as tetraciclinas no ambiente aquático. Segundo Li et al. (2013) já foram caracterizadas no banco de dados de genes de resistência a antimicrobianos, 113 gêneros e 530 espécies bacterianas e 41 tipos de genes de resistência relacionado as tetraciclinas até a data.

### **3.6 Quinolonas e mecanismos de resistência em *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp.**

As quinolonas são uma família de antimicrobianos sintéticos descobertas por Lescher e colegas em 1962 quando estudavam a estrutura da quinina. Os pesquisadores observaram que a molécula 1,8-naftiridina possuía atividade antibacteriana e a partir dela originou-se o ácido nalidíxico (TILLOTSON, 1996). Ainda que tenha sido o primeiro antimicrobiano dessa classe a ser administrado em ensaios clínicos, o surgimento de resistência ao ácido nalidíxico foi rápido, a partir disso, surgiram as fluoroquinolonas tais como norfloxacin e ciprofloxacina. As quinolonas assim como as fluoroquinolonas são amplamente utilizadas para o

tratamento de doenças infecciosas em humanos, animais, além de agricultura e aquicultura (AMINOV & MACKIE, 2007). Mundialmente são a segunda classe de antimicrobianos mais consumidos, com um total de 15% de todos os antimicrobianos utilizados pela população. Na França equivalem a 7,3% do total de antimicrobianos utilizados (GALLINI et al., 2012) e no Chile mais de 100 toneladas são usadas anualmente na medicina veterinária (HONG et al., 2013),

Esses antimicrobianos entram nas células através das porinas e seus alvos são a DNA girase e a topoisomerase IV e para contornar os alvos, as bactérias tem utilizado algumas estratégias, tais como: alteração do sítio alvo (resistência devido a mutações na DNA girase e topoisomerase IV) (ALDRED et al., 2014), alterações na permeabilidade do fármaco (mutações que aumentam a expressão de bombas endógenas de efluxo multidrogas, canais de difusão da membrana externa, ou ambos) (AMINOV & MACKIE, 2007). Além desses mecanismos utilizados, a espécie *P. aeruginosa*, por exemplo, é naturalmente resistente ao ácido nalidíxico (SILVA & HOLLENBACH, 2010).

Touati et al. (2008) observaram cepas de *Acinetobacter baumannii* de ambiente hospitalar com resistência intermediária ao ácido nalidíxico enquanto que foram susceptíveis a ciprofloxacina e segundo os autores a resistência ao ácido nalidíxico se deve a determinantes de resistência encontrados em plasmídeos que não conferiam resistência as fluoroquinolonas.

Vaz-Moreira et al. (2012) observaram 36% de *Pseudomonas* spp. resistentes ao ácido nalidíxico em uma estação de tratamento de água potável e 24% de *Pseudomonas* spp. resistentes ao mesmo antimicrobiano em uma amostra obtida de torneira. Ahmed et al. (2014) pesquisaram a qualidade de amostra de água potável e observaram que entre as *Pseudomonas* 85% foram resistentes ao ácido nalidíxico.

### **3.7 Identificação molecular de *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp.**

Métodos moleculares têm sido utilizados para a identificação de *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp., técnicas que utilizam o sequenciamento dos genes que codificam o 16S rRNA ou dos genes *rpoD* e *rpoB* são comumente usadas para a identificação desses microrganismos (LI et al., 2013; BHUSHAN et al., 2013).

Novas tecnologias que visam à rapidez na identificação bacteriana, além de diminuição de custos, estão surgindo e com isso substituindo técnicas que antes eram consideradas padrão para a identificação molecular de microrganismos. Como é o caso do MALDI-TOF MS, que é uma técnica promissora que pode rapidamente identificar microrganismos (HRABÁK et al., 2013).

Nos últimos anos, *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) tem sido cada vez mais utilizado para a identificação bacteriana (BUYLLA et al., 2012) uma vez que apresenta benefícios econômicos e de diagnóstico. Ainda que o custo inicial para a aquisição do espectrômetro seja relativamente alto, o custo de identificação de uma espécie permanece baixo quando comparado com o custo de técnicas moleculares e bioquímicas (HRABÁK et al., 2013).

De acordo com Olmos et al. (2012) a técnica é baseada nas massas moleculares das proteínas e produz impressões de espectros de massas específicos para diferentes organismos. Segundo Sandrin et al. (2013), MALDI-TOF MS é uma ferramenta promissora para a caracterização de bactérias de relevância médica e ambiental. Mulet et al. (2012) verificaram a aplicabilidade dessa ferramenta para a identificação de *Pseudomonas* e concluíram que é uma excelente técnica para a identificação desse microrganismo. Buylla et al. (2012) verificaram a aplicabilidade dessa ferramenta em *Acinetobacter* e os resultados indicaram que a metodologia é promissora para a identificação dessas bactérias.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular 222-F do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **4.1 Meios de Cultura e Soluções**

Os meios de cultura e soluções utilizados nos experimentos deste trabalho estão descritos nos anexos.

### **4.2 Descrição da área de estudo e coleta das amostras**

A Laguna de Tramandaí está localizada no litoral norte do Rio Grande do Sul, entre os municípios de Imbé e Tramandaí (CAMPELLO, 2006). É considerada uma das maiores lagunas da costa brasileira e no Rio Grande do Sul é o segundo maior estuário, menor apenas que o da Lagoa dos Patos. Em sua extensão, possui aproximadamente 18,5 Km<sup>2</sup>, onde a pesca artesanal é uma atividade muito comum (GONÇALVES & D'INCAO, 2016). A Laguna de Tramandaí faz parte da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí que inclui dezessete municípios com uma área total de 2700 Km<sup>2</sup> e estende-se desde as nascentes dos rios Maquinés e Três Forquilhas, até o norte da Lagoa Itapeva e até o sul da Lagoa da Cerquinha. Todos escoam na Foz do Rio Tramandaí que desagua na Laguna de Tramandaí e conseqüentemente, entra em contato com o mar. O canal de comunicação com o oceano possui cerca de 1,5 km de extensão com largura máxima de 300 m, mínima de 60 m e profundidade média de 3 m (CAMPELLO, 2006).

Nas margens da laguna têm-se os municípios de Tramandaí e Imbé, juntos constituem um dos maiores aglomerados urbanos do litoral norte gaúcho. A população residente dos dois municípios atinge mais de 65000 habitantes, no qual mais 40000 residem no município de Tramandaí e mais de 20000 em Imbé (IBGE, 2016). De acordo com o Plano da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, a população residente na Bacia representa 2% da população total do Estado, entretanto, em

época de veraneio, a população aumenta em torno de cinco vezes, chegando a atingir praticamente 1 milhão de habitantes, representando cerca de 10% da população total do Rio Grande do Sul.

Situada apenas 100 Km de Porto Alegre, Tramandaí é considerada a “capital das praias” e devido a proximidade com a região metropolitana, o turismo e o crescimento desordenado dos municípios de Imbé e Tramandaí, tem tornado em evidência a contaminação da Laguna por esgotos domésticos. A rede de coleta e tratamento de esgotos em Tramandaí abrange cerca de 15% do total de domicílios do município e 13% da população residente. Imbé, por sua vez, não possui rede de coleta ou de tratamento de esgotos em funcionamento e o sistema utilizado pela população é o de fossas sépticas (CAMPELLO, 2006). De acordo com Moraes (2011), além dos dados oficiais sobre a laguna, muitos domicílios realizam a canalização irregular dos dejetos, diretamente para o corpo hídrico, o que vem a contribuir para a contaminação do local.

Também, Silva et al. (2001) relatam que o estuário vem sofrendo com o aumento da concentração de metais pesados, principalmente ferro e cobre, devido à atividade agrícola na bacia hidrográfica litorânea da porção norte do RS, com erosão do solo e transporte de sedimentos oriundos das rochas vulcânicas da Bacia do Paraná, desde o século XX. Além da adição de metais por intermédio de efluentes domésticos gerados em Tramandaí e Imbé.

As amostras de água superficial da Laguna de Tramandaí foram coletadas em quatro pontos de coleta com diferentes graus de impacto ambiental (FIGURA 1).

Ponto 1: Ponto de maior proximidade com o mar, situado junto a desembocadura da laguna. O local apresenta acentuada urbanização e conta com um terminal marítimo de exploração de petróleo (Terminal Marítimo Almirante Dutra).

Ponto 2: Local mais interno e protegido da influência das correntes marinhas, localizado onde um dos braços do Rio Tramandaí se insere na laguna. Ainda há acentuada urbanização nesta zona, situando-se o ponto junto ao trapiche da saída de um condomínio residencial horizontal de Imbé.



Ponto 3: Localiza-se no centro da Laguna, ponto de confluência com as águas do Rio Tramandaí, representando aporte de toda a Bacia. Não há urbanização nas margens do entorno.

Ponto 4: Situa-se às margens de um foco de mata nativa, porém próximo a regiões de plantação agrícola e atividades pecuárias. Não há urbanização nas margens do entorno.



FIGURA 1: Localização dos pontos de coleta da Laguna de Tramandaí. Ponto 1: Foz do estuário. Ponto 2: Trapiche de um condomínio horizontal de Imbé, ponto interno da Laguna. Ponto 3: Centro da Laguna. Ponto 4: margem da Laguna com urbanização ausente.

As amostras de todos os pontos foram coletadas com o auxílio do barco de coletas do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) da UFRGS. As coletas foram realizadas em agosto de 2014 e em janeiro de 2015. Em cada ponto de coleta frascos de vidros estéreis foram içados com corda (1m)

com o intuito de se obter 2 L de água superficial de cada ponto. Após a coleta as amostras foram mantidas a 4°C até proceder com as análises microbiológicas, realizada em até 24 h.

### **4.3 Isolamento de bactérias heterotróficas na água**

Para o isolamento bacteriano, 25 mL de água de cada ponto de coleta foram adicionados em 25 mL de caldo nutriente suplementado com ácido nalidíxico, ceftazidima, imipenem e tetraciclina separadamente, na concentração de 20 mg/L (LI et al., 2013) e incubados a 35°C por 24 h. Também foram adicionados 25 mL de água de cada ponto de coleta em 25 mL de caldo nutriente sem nenhum composto adicional. O ácido nalidíxico e a tetraciclina foram escolhidos por pertencerem a diferentes classes de antimicrobianos e apresentarem diferentes alvos de ação. Enquanto que os outros antimicrobianos pertencem a classe dos  $\beta$ -lactâmicos, sendo que os carbapenêmicos, tais como o imipenem, são tidos como última linha de defesa para o tratamento de infecções bacterianas ocasionadas por microrganismos gram-negativos não fermentadores e a ceftazidima é uma cefalosporina de terceira geração e isolados bacterianos resistentes a ceftazidima tipicamente codificam  $\beta$ -lactamases de espectro estendido.

Após o tempo de incubação, as amostras passaram por diluições seriadas e 25  $\mu$ L das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-12}$  foram depositados por meio da técnica *drop plate* em ágar PCA e Ágar marinho contendo ou não cada um dos respectivos antimicrobianos e cultivados a 35°C por 24 h. No dia seguinte, foram selecionadas diferentes colônias que foram esgotadas em ágar TSA com e sem os antimicrobianos e incubadas a 35°C por 24 h. Em seguida, os isolados foram estocados em ágar conservação e a manutenção das culturas puras foi realizada através da inoculação em ágar TSA inclinado.

### **4.4 Triagem e Identificação bioquímica de *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp.**

Os microrganismos obtidos no isolamento foram submetidos à coloração de Gram e teste do hidróxido de potássio (KOH). Em seguida, passaram por uma

triagem bioquímica que envolveu as seguintes etapas: semeadura em ágar MacConkey, semeadura em TSI, testes da catalase e oxidase. Após a triagem bioquímica, os possíveis *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. foram identificados por meio de KIT de bacilos não-fermentadores da NEWPROV, o qual compreende os testes bioquímicos: OF-Glicose, OF-Basal, caldo BHI, ágar cetrimide, gelatina, ágar nitrato-motilidade, OF-Xilose, OF-Maltose, OF-Lactose. A interpretação dos resultados foi conforme a tabela da NEWPROV e confirmada por MALDI-TOF.

#### **4.5 Identificação bacteriana por MALDI – TOF MS.**

A partir do ágar conservação, os isolados foram cultivados a 35°C por 24 h em caldo BHI para recuperação dos mesmos. No dia seguinte, os isolados foram semeados em ágar TSA e incubados a 35°C por 18 h. Após, uma única colônia de cada isolado foi retirada do ágar TSA e transferida diretamente sobre cada *spot* na placa alvo do MALDI-TOF. Posteriormente, foi adicionado sobre cada *spot* 1 µl de solução matriz HCCA e esperou-se secar a temperatura ambiente. Em seguida a placa foi colocada no Microflex LT/SH (BrukerDaltonics) e a identificação dos isolados foi realizada pelo software MALDI Biotyper 4.0 com base no perfis gerados. Os isolados foram considerados corretamente identificados ao nível de gênero quando os scores foram  $\geq 1,7$  e ao nível de espécie, quando os scores foram  $\geq 2$ .

#### **4.6 Análise da susceptibilidade a antimicrobianos**

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi determinado por meio do método de disco difusão em ágar Mueller Hinton, no qual foram utilizados 17 antimicrobianos de seis classes distintas (TABELA 1).

Os isolados bacterianos foram semeados em placas de TSA e incubados a 35°C por 24 h. Em seguida, com auxílio de alça de platina foram retiradas colônias do TSA e inoculadas em solução salina 0,9% (concentração fisiológica) até que atingissem a turbidez correspondente a 0,5 da Escala de McFarland. Após o preparo do inóculo, os mesmos foram semeados com suabes estéreis em placas de 150mm contendo Ágar Muller Hinton. Os discos dos antimicrobianos foram dispostos nas placas semeadas que foram incubadas por 18 h a 35°C. Os diâmetros dos halos de

inibição foram medidos e os resultados interpretados de acordo com os critérios determinados pelo CLSI (2015). Os isolados que apresentaram fenótipo resistente e intermediário foram incluídos na categoria de suscetibilidade reduzida. Os isolados foram considerados multirresistentes quando apresentaram resistência a pelo menos quatro classes distintas de antimicrobianos.

TABELA 1: Antimicrobianos utilizados para análise do perfil de suscetibilidade de *Pseudomonas sp.* e *Acinetobacter sp.*

Classe/Sub-Classe	Antimicrobianos	Concentração do disco	Sigla	Marca
Aminoglicosídeos	Amicacina	30 µg	AMI	OXOID
	Gentamicina	10 µg	GEN	OXOID
Carbapenêmicos	Ertapenem	10 µg	ETP	OXOID
	Imipenem	10 µg	IMP	OXOID
	Ceftazidima	30 µg	CAZ	OXOID
	Cefepima	30 µg	COM	OXOID
Cefalosporinas	Cefotaxima	30 µg	CTX	OXOID
	Cefoxitina	30 µg	FOX	OXOID
	Aztreonam	30 µg	ATM	OXOID
Monobactâmicos	Ampicilina	10 µg	AMP	OXOID
	Amoxicilina – ácido clavulânico	30 µg	AMC	OXOID
Penicilinas	Piperacilina – tazabactam	110 µg	TZP	OXOID
	Cloranfenicol	30 µg	CLO	OXOID
Fenicóis	Ciprofloxacina	5µg	CIP	OXOID
	Norfloxacina	10 µg	NOR	OXOID
Fluoroquinolonas	Sulfametoxazol-trimetoprima	25 µg	SUT	OXOID
Sulfonamidas	Tetraciclina	30 µg	TET	OXOID
Tetraciclinas				

A metodologia de disco combinado foi empregada com o objetivo de testar a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL). Os isolados bacterianos foram semeados em placas de TSA e incubados a 35°C por 24 h. Posteriormente, com auxílio de alça de platina foram retiradas colônias do TSA e inoculadas em solução salina 0,9% (concentração fisiológica) até que atingissem a turbidez correspondente a 0,5 da Escala de McFarland. Após o preparo do inóculo, os mesmos foram semeados com suabes estéreis em placas de 150mm contendo Ágar Muller Hinton.

Foram adicionados 10 µL de ácido clavulânico nos discos dos antimicrobianos: aztreonam, cefepima, ceftazidima, cefotaxima e cefoxitina. Em

seguida, os discos dos antimicrobianos com o inibidor foram posicionados nas placas a 2 cm dos discos sem o inibidor.

As placas foram incubadas por 18 h a 35°C. Os resultados foram considerados positivos para a produção de ESBL quando houve aumento  $\geq 5$ mm da zona de diâmetro do antimicrobiano testado em combinação com ácido clavulânico, comparado com aquele que não continha o inibidor (CLSI, 2015).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Crescimento de *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. em meio de cultura suplementado com antimicrobianos de acordo com o ponto de coleta

Foram isolados das amostras de água com e sem antimicrobianos 846 isolados, dos quais 343 foram obtidos de meios de cultura sem antimicrobianos e 503 de meios de cultura suplementados com antimicrobianos. Após a triagem bioquímica, 194 isolados foram selecionados como possíveis *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp., sendo, 82 provenientes dos meios de cultura com antimicrobianos e 112 oriundos dos meios de cultura sem antimicrobianos. Por meio das provas bioquímicas foram confirmados 138 isolados de *Pseudomonas* sp., dos quais 61 dos meios de cultura com antimicrobianos e 77 sem os antimicrobianos e 25 isolados de *Acinetobacter* sp., 13 obtidos sem os antimicrobianos e 12 com os antimicrobianos. Quando realizada a confirmação através de MALDI-TOF, dos 138 isolados de *Pseudomonas* sp., 15 foram identificados como *Alcaligenes faecalis* e um como *Stenotrophomonas maltophilia*, sendo esses excluídos do estudo. Os demais foram confirmados como *Pseudomonas aeruginosa* pela identificação por MALDI-TOF.

Portanto, nesse estudo foram utilizados 122 isolados de *P. aeruginosa* e 25 de *Acinetobacter*. A identificação dos isolados de *Acinetobacter* sp. não foi confirmada por MALDI-TOF devido a dificuldades para a recuperação dos isolados, dessa maneira, são apresentados somente os resultados dos testes bioquímicos. Corroborando com o presente trabalho, outros estudos relatam que somente a identificação bioquímica não é suficiente para a discriminação de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* e *A. faecalis* sendo necessária a utilização de técnicas complementares para a identificação (KHANOLKAR et al., 2015; SALA-COMOMERA et al., 2016).

Na TABELA 2 pode-se verificar o número de isolados de *P. aeruginosa* obtidos das amostras de água oriundas da Laguna de Tramandaí. Foram obtidos, 58 isolados de *P. aeruginosa* das amostras com os antimicrobianos: ácido nalidíxico, ceftazidima, imipenem e tetraciclina e 64 isolados de *P. aeruginosa* foram obtidos das amostras não suplementadas com os antimicrobianos. Na TABELA 3 pode-se observar o número de isolados de *Acinetobacter* sp., dos 25 isolados, 13 foram recuperados das amostras suplementadas com os antimicrobianos e 12 das amostras não suplementadas com antimicrobianos. A quantidade de *P. aeruginosa* e

*Acinetobacter* sp. resistentes variaram de acordo com cada ponto e também com os antimicrobianos utilizados no tratamento das amostras (TABELAS 2 e 3).

TABELA 2: Número de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos de amostras de água da Laguna de Tramandaí suplementadas ou não com antimicrobianos segundo os pontos de coleta.

		N° de isolados	Ponto de Coleta			
			P1	P2	P3	P4
Sem antimicrobiano	-	64	22	17	16	9
	Ácido Nalidíxico	37	5	7	11	14
Com antimicrobiano	Ceftazidima	3	0	2	1	0
	Imipenem	7	1	0	5	1
	Tetraciclina	11	6	0	4	1

Ponto 1: Foz do estuário. Ponto 2: Trapiche de um condomínio horizontal de Imbé, ponto interno da Laguna. Ponto 3: Centro da Laguna. Ponto 4: margem da Laguna com urbanização ausente.

TABELA 3: Número de *Acinetobacter* sp. obtidos de amostras de água da Laguna de Tramandaí suplementadas ou não com antimicrobianos segundo os pontos de coleta.

		N° de isolados	Ponto de Coleta			
			P1	P2	P3	P4
Sem antimicrobiano	-	12	3	3	4	2
	Ácido Nalidíxico	0	0	0	0	0
Com antimicrobiano	Ceftazidima	1	0	0	0	1
	Imipenem	12	0	3	7	2
	Tetraciclina	0	0	0	0	0

Ponto 1: Foz do estuário. Ponto 2: Trapiche de um condomínio horizontal de Imbé, ponto interno da Laguna. Ponto 3: Centro da Laguna. Ponto 4: margem da Laguna com urbanização ausente.

Todos os pontos de coleta apresentaram isolados de *P. aeruginosa* resistentes a algum dos antimicrobianos testados (TABELA 2). Os pontos 1 e 4 não apresentaram *P. aeruginosa* resistente à ceftazidima, enquanto que o ponto 2 não exibiu isolados resistentes ao imipenem e à tetraciclina. No ponto 3 foram encontrados isolados de *P. aeruginosa* resistentes a todos os antimicrobianos utilizados no tratamento das amostras.

O tratamento que selecionou o maior número de *P. aeruginosa* resistentes foi com ácido nalidíxico. A resistência ao ácido nalidíxico era esperada, uma vez que essa espécie apresenta resistência intrínseca a esse antimicrobiano (RELLA &

HASS, 1982). Essa característica é ocasionada pela baixa permeabilidade de sua membrana externa que é de 12 a 100 vezes menos permeável do que *Escherichia coli*. A membrana externa de *P. aeruginosa* age como uma barreira seletiva para entrada de alguns antimicrobianos sendo que a passagem em alguns casos seja dependente do tamanho da molécula (BREIDENSTEIN et al., 2011). Resultados semelhantes a esse trabalho foram encontrados por Nashnoush et al. (2009), que obtiveram isolados de *P. aeruginosa* em amostras de água com fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico.

O tratamento das amostras com tetraciclina também selecionou isolados de *P. aeruginosa* resistentes, com exceção do ponto 2. A resistência a tetraciclina pode ser ocasionada por genes *tet* encontrados em plasmídeos, que tipicamente codificam um sistema de efluxo de tetraciclina, ou mutações podem ocorrer no ribossomo protegendo este da ação da tetraciclina (ROBERTS, 1996).

As tetraciclinas entram em ambientes aquáticos, principalmente por meio de águas residuais e também através da agricultura, uma vez que são muito utilizadas na prevenção de doenças em plantas. Além disso, também é comum serem manipuladas em práticas aquícolas para o tratamento de doenças em peixes e na pecuária como promotores de crescimento animal e devido a sua ampla utilização, a contaminação de ambientes aquáticos com tetraciclina tem se tornado comum, o que tem levado a seleção de microrganismos resistentes a esse antimicrobiano no ambiente aquático (MARTINS et al., 2014).

Suzuki et al. (2013), avaliaram a presença de *P. aeruginosa* em dois rios situados na cidade de Myazaki e obtiveram das amostras de água coletadas, 516 isolados de *P. aeruginosa* e destes, 298 foram resistentes a tetraciclina. Em outro estudo, com amostras de água do Rio Drweca na Polônia, um ambiente considerado uma reserva natural, mas que tem sofrido com o escoamento superficial de áreas agrícolas, Harnisz et al. (2011) obtiveram *P. putida* e *P. fluorescens* de um tratamento com tetraciclina. Os autores salientaram que as maiores percentagens de isolados resistentes a tetraciclina foram encontradas nas amostras de água obtidas de uma parte do rio situado atrás de explorações piscícolas e que os microrganismos resistentes a tetraciclina poderiam ser oriundos dos efluentes de piscicultura, uma vez que esse antimicrobiano é muito utilizado para o tratamento de doenças em peixes.



No estuário também foram encontrados *P. aeruginosa* resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos imipenem e ceftazidima, porém em menor número. A resistência ao imipenem foi observada somente nos pontos P1 e P4 e a resistência a ceftazidima nos pontos P2 e P3. De acordo com Lachmayr et al. (2009) cerca de dois terços dos antimicrobianos administrados em humanos são  $\beta$ -lactâmicos, sendo este um dos fatores que influenciam a existência do principal mecanismo de resistência bacteriana, a hidrólise de antimicrobianos devido a produção de beta-lactamases, além destes, outros mecanismos também podem influenciar na resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, tais como as bombas de efluxo e a perda ou diminuição da expressão de porinas. Alouache et al. (2012) coletaram amostras de água do mar de quatro locais com diferentes graus de poluição e obtiveram 7,2% dos isolados resistentes a ceftazidima e 5,4% resistentes ao imipenem. Em outro estudo, Spindler et al. (2012) obteve de amostras de efluente hospitalar 47,6% de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima. Fuentesfria et al. (2011) encontrou em amostras de água superficial 22,6% de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem.

Diferentemente de *P. aeruginosa*, os isolados de *Acinetobacter* sp. não foram encontrados nas amostras de água da Laguna em grandes quantidades, tanto sem o tratamento com antimicrobianos como com o tratamento. A ocorrência de *Acinetobacter* em ambiente aquático permanece muito limitada e varia de acordo com a espécie (XIN et al., 2014). Shete et al. (2015) coletaram amostras de água de 4 praias e um estuário em diferentes distritos na Índia e obtiveram apenas 11 isolados de *Acinetobacter* spp., entre as espécies identificadas destacam-se *A. haemolyticus* e *A. junii*. Em outro estudo, Xin et al. (2014) coletaram amostras de água em diferentes pontos no Rio Qiandeng, localizado na Província de Jiansu na China e obtiveram apenas 12 isolados de *Acinetobacter* sp., sendo que quando realizada a confirmação molecular ao nível de espécie, os isolados foram identificados como *A. johnsonii*, *A. bouveti*, *A. haemolyticus*, *A. lwoffii*, *A. guillouiae*.

Na Laguna de Tramandaí foram encontrados isolados resistentes de *Acinetobacter* apenas nos pontos 2, 3 e 4. O ponto 1 não exibiu *Acinetobacter* sp. resistentes, enquanto que os demais pontos totalizaram 13 isolados resistentes. O Ponto 1 corresponde a foz do estuário, portanto deve apresentar salinidade superior aos demais pontos. De acordo com Oh et al. (2009), um fator que pode influenciar na abundância de *Acinetobacter* sp. em estuários é a salinidade. Os pesquisadores

compararam o crescimento de *Acinetobacter* em meios de cultivo suplementados com diferentes concentrações de sais (1%, 2% e 3%) e verificaram que o aumento da concentração influenciava fortemente no crescimento das espécies de *Acinetobacter* testadas, pois nas concentrações mais elevadas houve uma diminuição de *Acinetobacter*.

Em um estudo similar a presente pesquisa, Maravic et al. (2016) coletaram amostras de água do Rio Jadro, localizado na costa oriental do mar Adriático na Croácia. Esse rio é caracterizado como um estuário que recebe forte influência de água do mar, também águas superficiais de zonas agrícolas e residuais municipais são descarregadas no local. Os autores realizaram coletas em dois locais ao longo do Rio, sendo que o local A, corresponde a desembocadura do estuário, enquanto que o local B, representa uma parte mais distante da desembocadura, porém impactado por efluentes de águas residuais e águas superficiais da zona agrícola. Foram obtidos 57 isolados de *Acinetobacter* sp. no Rio Jadro, entretanto, destes, apenas 19 foram recuperados do local A e os 38 restantes foram obtidos do local B. Ainda, a salinidade foi medida e os resultados indicaram o local A composto por água salobra e o B tipicamente constituído por água doce. Assim como na nossa pesquisa, os autores também encontraram diminuição de isolados do gênero *Acinetobacter* sp. em um ponto caracterizado por águas salobras.

Além da salinidade, Bazyleu & Kumar (2014), relacionam a temperatura como um importante fator com capacidade de influenciar a resistência bacteriana. Os autores avaliaram a resistência de isolados de *Acinetobacter baumannii* em diferentes temperaturas (30°C e 37°C) e observaram que a temperatura de 37°C favorecia o aparecimento de isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem, a ciprofloxacina, a gentamicina, ao cotrimoxazol, a clindamicina e a ceftriaxona, enquanto que na temperatura de 30°C foram encontrados *A. baumannii* sensíveis a esses antimicrobianos. Em nosso estudo, os 13 isolados de *Acinetobacter* sp. resistentes foram obtidos da coleta realizada no verão. E diante das constatações realizadas pelos autores citados, talvez na presente pesquisa, a temperatura não seja o fator desencadeante da não existência de *Acinetobacter* sp. resistentes no Ponto 1, uma vez que se realmente fosse a temperatura, poderiam ser encontrados *Acinetobacter* sp. resistentes no respectivo ponto, já que todos os isolados de *Acinetobacter* sp. obtidos das amostras com o tratamento com os antimicrobianos,

foram recuperados da coleta realizada no verão. Sendo assim, a hipótese mais plausível seria a salinidade.

O imipenem foi o antimicrobiano que exibiu maior número de isolados de *Acinetobacter* sp. resistentes seguido de ceftazidima. A resistência exibida por esse gênero aos  $\beta$ -lactâmicos é bem comum (MARAVIC et al., 2016). Chen et al. (2013) relatam o aumento de *Acinetobacter* sp. resistente aos carbapenêmicos nos últimos anos, sendo a expressão de carbapenamases intrínsecas e adquiridas os mecanismos de resistência responsáveis por esse fenótipo. De acordo com Gilad & Carmeli (2008) *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos têm sido encontrados no mundo todo. Estudos também relatam que a resistência as cefalosporinas, pode ser ocasionada por uma cefalosporinase codificada cromossomicamente (*AmpC*) que confere resistência a essa sub-classe, no entanto, a principal causa de resistência as cefalosporinas de terceira geração em *Acinetobacter* sp. é a produção de ESBL (PFEIFER et al., 2010).

Não foram encontrados isolados de *Acinetobacter* sp. resistentes após tratamento da amostra com os antimicrobianos ácido nalidíxico e tetraciclina. Diferentemente de *P. aeruginosa*, que é intrinsecamente resistente ao ácido nalidíxico, em *A. baumannii*, esta resistência pode estar associada a mutações cromossomais em regiões determinantes de resistência as quinolonas (LIU et al., 2012). A resistência a tetraciclina, assim como em *P. aeruginosa*, também pode ser mediada por plasmídeos que contém genes *tet* (HARNISZ et al., 2015). Como visto acima, no presente estudo, não foram encontrados isolados de *Acinetobacter* sp. resistentes à tetraciclina. O contrário ocorreu com HARNISZ et al. (2015), que submeteram amostras águas de uma estação de tratamento de águas residuais e do rio receptor (Rio Lyna, localizado na Polônia) a tratamento com os antimicrobianos oxitetraciclina e doxicilina e obtiveram 62 isolados de *Acinetobacter* sp. resistentes a esses antimicrobianos. Em outro estudo, Girlich et al. (2010) obtiveram um isolado de *A. baumannii* resistente ao ácido nalidíxico, a ceftazidima e ao imipenem recuperado de amostra de água do Rio Seine em Paris, como resultado de uma triagem de isolados multirresistentes.

Quando analisados os isolados de *P. aeruginosa* obtidos das amostras suplementadas com antimicrobianos em relação aquelas sem os antimicrobianos (FIGURA 2), pode-se observar que os pontos 1 e 2 exibiram maior número de *P.*

*aeruginosa* oriundos das amostras sem os antimicrobianos. Por outro lado, a quantidade de isolados de *Acinetobacter* sp. resistentes (FIGURA 3) foi igual ou superior aos isolados das amostras sem tratamento, com exceção do ponto 1.

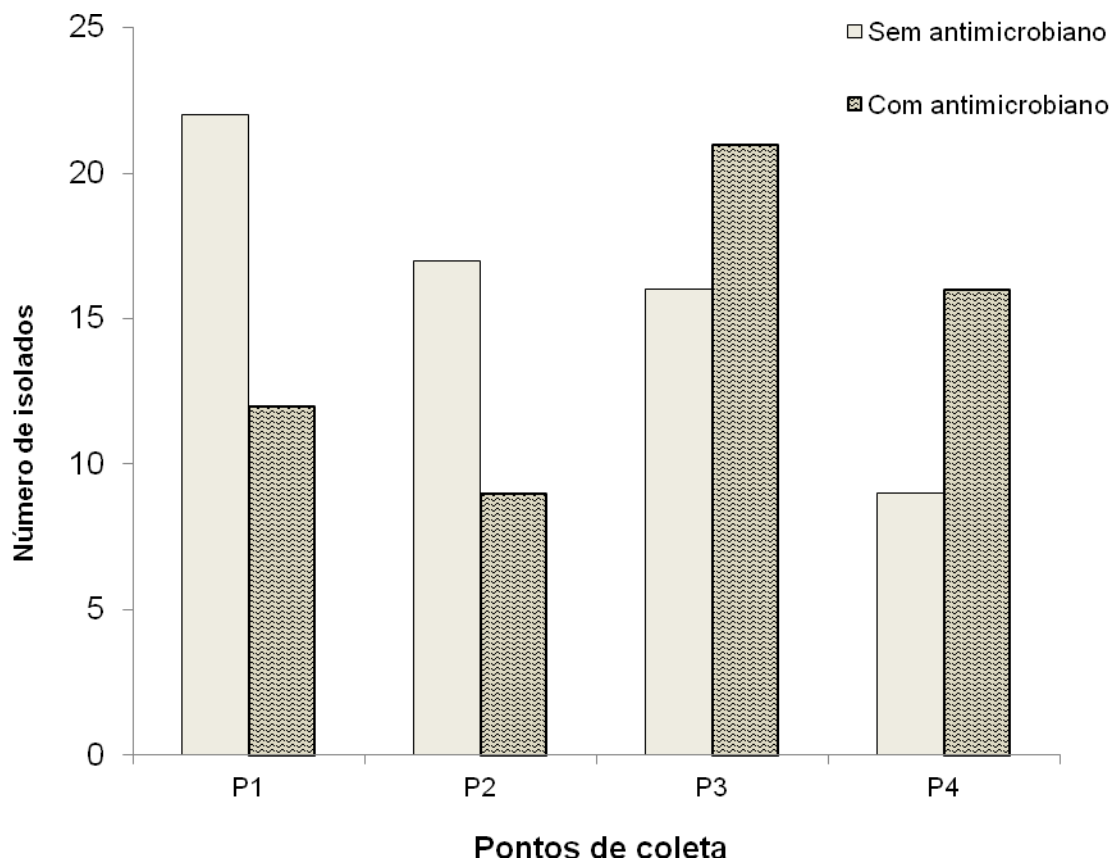


FIGURA 2: Comparação entre o número de *Pseudomonas aeruginosa* com e sem o tratamento com os antimicrobianos de acordo com o ponto de coleta. Ponto 1: Foz do estuário. Ponto 2: Trapiche de um condomínio horizontal de Imbé, ponto interno da Laguna. Ponto 3: Centro da Laguna. Ponto 4: margem da Laguna com urbanização ausente.

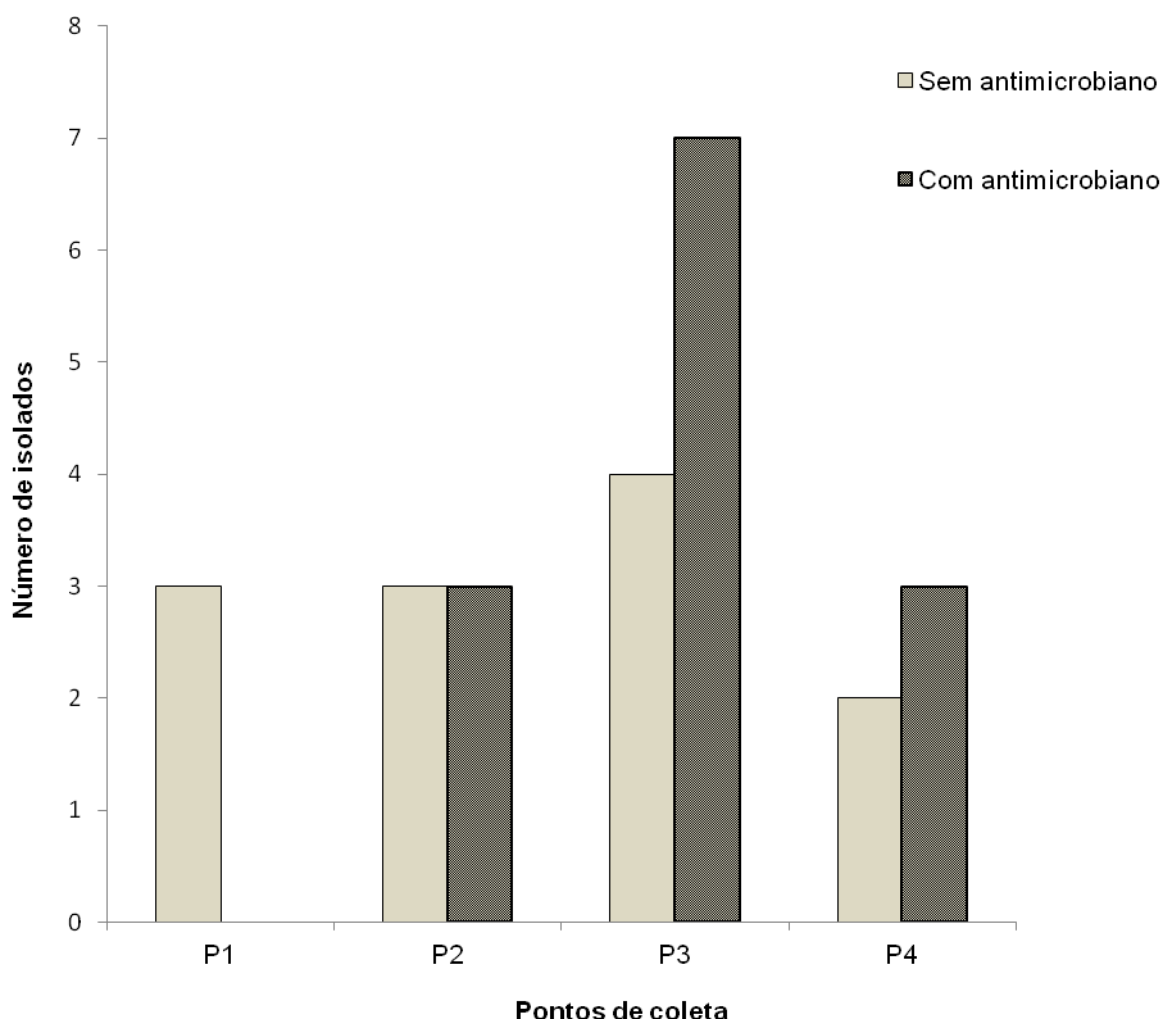


FIGURA 3: Comparação entre o número de *Acinetobacter* sp. com e sem o tratamento com os antimicrobianos de acordo com o ponto de coleta. Ponto 1: Foz do estuário. Ponto 2: Trapiche de um condomínio horizontal de Imbé, ponto interno da Laguna. Ponto 3: Centro da Laguna. Ponto 4: margem da Laguna com urbanização ausente.

O esperado era que os pontos 1 e 2 apresentassem maior quantidade de bactérias resistentes em relação aos demais, uma vez que nesses pontos a ação antrópica é maior que nos outros. No entanto, como se pode observar, os pontos 3 e 4 foram os que mais exibiram *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp. resistentes aos antimicrobianos. Logo, ao comparar os dois pontos, verifica-se que o P3 foi o que exibiu maior quantidade de *P. aeruginosa* resistentes e *Acinetobacter* sp. resistentes. Uma hipótese para explicar a abundância desses microrganismos no centro da Laguna, poderia ser a existência de correntes de água que se concentrariam no

ponto 3, já que esta recebe o desague de águas oriundas de rios que poderiam estar se concentrando nesse ponto.

A hipótese para a resistência de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp., no ponto 4 seria devido a plantações que ocorrem nas proximidades do local e uma criação pecuária, cujas partículas de solo com contaminantes e microrganismos resistentes podem ser depositados dentro da Laguna por meio de lixiviação. Corroborando com os resultados do presente estudo, Moraes (2011) relatou que alguns microrganismos encontrados na Laguna de Tramandaí podem ser originários de solos adjacentes ao corpo hídrico, pois em sua pesquisa com amostras de água da Laguna de Tramandaí, a autora obteve teores altos (mais do que 10.000 NMP/100mL) de coliformes totais presentes nas amostras e salientou que podem ser provenientes de lixiviação do solo ou devido a canalização de esgoto irregular na Laguna. Thiele-Bruhn (2003) afirma que o solo pode atuar como uma fonte de contaminantes de antimicrobianos para o ambiente aquático, principalmente por lixiviação e escoamento superficial.

A utilização de antimicrobianos no tratamento de animais em pastagens e como promotores de crescimento animal também podem auxiliar na presença de bactérias resistentes no ambiente aquático, pois, os resíduos de antimicrobianos liberados no solo podem subsequentemente ser transportados para águas superficiais ou subterrâneas e com isso influenciar na resistência bacteriana (WRIGHT, 2010; WELLINGTON et al., 2013; AL-BAHRY et al., 2014).

## **5.2 Perfil de resistência entre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp.**

Os 122 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e os 25 isolados de *Acinetobacter* sp. obtidos das amostras com e sem o tratamento com antimicrobianos foram submetidos ao teste de disco-difusão. Todos os isolados (ambos os gêneros) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano no teste de disco-difusão e não foi observado nenhum isolado sensível a todos os antimicrobianos testados. Um dos isolados de *P. aeruginosa* exibiu resistência a todos os agentes antimicrobianos utilizados na presente pesquisa.

Dos 64 isolados de *P. aeruginosa* obtidos das amostras sem tratamento com antimicrobianos, os maiores percentuais de resistência (acima de 70%)

estiveram relacionados a amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina, cefotaxima, cefoxitina, ertapenem e cotrimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprima). A resistência a esses antimicrobianos foi observada em todos os pontos de coleta (TABELA 4).

TABELA 4: Percentual de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes e multirresistentes de amostras de água superficial submetidas ou não a tratamento com antimicrobianos, segundo os pontos de coletada da Laguna de Tramandaí/RS.

Antimic.	Sem tratamento				Tratamento			
	P1=22'	P2= 17'	P3=16'	P4=9'	P1 =12'	P2=9'	P3=21'	P4=16'
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
AMI	1(4,5)	1(5,9)	0	0	1(8,3)	0	2 (9,5)	2(12,5)
GEN	0	1(5,9)	1(6,2)	0	1(8,3)	1(11,1)	6(28,6)	1(6,2)
CLO	20(90,9)	17(100)	15(93,7)	6(66,8)	10(83,3)	4(44,4)	14(66,7)	11(68,7)
AMC	20(90,9)	16(94,1)	14(87,5)	9(100)	12(100)	9(100)	20(95,2)	15(93,7)
AMP	21(95,4)	16(94,1)	15(93,7)	9(100)	12(100)	9(100)	20(95,2)	16(100)
TZP	1(4,5)	0	1(6,2)	0	2(16,7)	0	1(4,8)	1(6,2)
ATM	19(86,4)	13(76,4)	8(50)	5(55,5)	6(50)	2 (22,2)	6(28,6)	4(25)
CAZ	2(9,1)	1(5,9)	1(6,2)	0	2(16,7)	2 (22,2)	7(33,3)	2(12,5)
CPM	5(22,7)	0	0	1(11,1)	1(8,3)	1(11,1)	6(28,6)	0
CTX	19(86,4)	15(88,2)	15(93,7)	7(77,8)	10(83,3)	7 (77,8)	17(80,9)	12(75)
FOX	20(90,9)	15(88,2)	15(93,7)	8(88,9)	12(100)	9(100)	21(100)	16(100)
CIP	2(9,1)	0	0	0	1(8,3)	1 (11,1)	9(42,8)	1(6,25)
NOR	1(4,5)	0	1(6,2)	0	2(16,7)	1 (11,1)	8 (38,1)	1(6,25)
ETP	21(95,4)	14(82,3)	12(75)	7(77,8)	4(33,3)	2 (22,2)	7(33,3)	3(18,7)
IMP	0	0	1(6,2)	1(11,1)	1(8,33)	2 (22,2)	6(28,6)	1(6,2)
SUT	21(95,4)	16(94,1)	15(93,7)	8(88,9)	12(100)	9(100)	21(100)	16(100)
TET	13(59,1)	12(70,6)	10(62,5)	7(77,8)	11(91,7)	5(55,5)	18(75)	12(75)
MRD	12(54,5)	12(70,6)	9(56,25)	5(45)	9(75)	6(66,6)	15(71,4)	11(68,75)

\*Número total de isolados analisados. Ponto 1: Foz do estuário. Ponto 2: Trapiche de um condomínio horizontal de Imbé, ponto interno da Laguna. Ponto 3: Centro da Laguna. Ponto 4: margem da Laguna com urbanização ausente. AMI: amicacina, AMC: amoxicilina-ácido clavulânico, AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CPM: cefepima, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FOX: cefoxitina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ETP: ertapenem, GEN: gentamicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacina, TZP: piperacilina-tazobactam, SUT: sulfametoxazol-trimetoprima, TET: tetraciclina. MDR: multirresistente.

Os demais antimicrobianos mostraram percentuais entre 3,12% (amicacina, gentamicina, piperacilina-tazobactam, imipenem, ciprofloxacina, norfloxacina) e 65,6% (tetraciclina). Para alguns deles todos os isolados do ponto de coleta foram sensíveis. Em nosso estudo, a resistência ao imipenem foi baixa, no entanto, alta para o ertapenem (84,4%). De acordo com Shah & Isaacs (2003), a atividade de ertapenem para algumas espécies de *Pseudomonas*, tais como *P. aeruginosa* é limitada (MIC 16mg/L).

Em um estudo com amostras de água obtidas da Baía de Pucky (Polônia) uma zona costeira marinha impactada com águas residuais, Luczkiewicz et al.

(2015) também encontraram espécies de *Pseudomonas* com baixo percentual de resistência para os antimicrobianos amicacina (4,3%) e gentamicina, também para piperacilina-tazobactam (2,2%), ciprofloxacina (5%) e imipenem (6,5%). No entanto, a maioria dos isolados exibiu resistência ao aztreonam (54,8%). Em nosso estudo, 70,3% dos isolados de *P. aeruginosa* também foram resistentes a esse agente antimicrobiano, indicando a possível presença de ESBL, uma vez que a resistência ao aztreonam pode ser ocasionada por essas enzimas que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Os percentuais elevados de resistência exibido pelos isolados de *P. aeruginosa* ao aztreonam são dados muito preocupantes, pois esse antimicrobiano é utilizado para o tratamento de doenças infecciosas ocasionadas por *P. aeruginosa*.

Em outro estudo com amostras de água, Vaz-Moreira et al. (2012), encontraram *P. aeruginosa* com resistência acima de 80% aos  $\beta$ -lactâmicos, especialmente ao grupo das penicilinas e cefalosporinas. Ullah et al. (2012) também encontraram em amostras de água doce 94% de *P. aeruginosa* resistentes ao cloranfenicol e 84% resistentes ao cotrimoxazol. Ou et al. (2015) observaram em amostras de água na China, abundância de *Pseudomonas* resistentes a sulfonamidas e ampicilina e resistência intermediária a florfenicol, cloranfenicol, tetraciclina e outros, indicando que bactérias de corpos de águas costeiras tem se tornado um reservatório de multirresistência. Ahmed et al. (2014) encontraram em amostras de água utilizada para consumo *Pseudomonas* resistentes a penicilina, ampicilina, amoxicilina e a eritromicina. No Brasil, Nascimento e Araújo (2014) em uma revisão sobre resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de ambientes aquáticos constataram que os antimicrobianos com os maiores percentuais de resistência no país foram ampicilina (84,6%), cloranfenicol (58,8%) e cotrimoxazol (78,5%).

Ao analisar a resistência média por ponto (soma das percentagens de resistência dividida pelo número de isolados do ponto) observou-se que o Ponto 4 apresentou a maior média (83,96%), sendo que as percentagens de resistência variaram de 11,1% a 100%, seguidos pelos Ponto 3 (48,4%), Ponto 2 (47,4%) e Ponto 1 (38,41%). O Ponto 4 está situado na margem interna da Laguna onde estão concentradas atividades agrícolas e de pecuária, as quais podem estar contribuindo para estes altos níveis de resistência.



O Brasil está entre um dos maiores consumidores de antimicrobianos atualmente e estudos afirmam que o país iniciou uma mudança em direção a sistemas de produção de gado mais intensificado utilizando antimicrobianos para manter a saúde animal e aumentar a produtividade (BOECKEL et al., 2015) e com isso vem a colocar em risco ambientes aquáticos, pois de acordo com Martinez et al. (2009), as atividades pecuárias e agrícolas são consideradas agentes causadoras de poluição do ambiente aquático.

No sul do Brasil, Canal et al. (2016) isolaram *E. coli* multirresistentes da Lagoa dos Patos, um ambiente caracterizado por receber forte influência antrópica, onde são realizadas atividades agrícolas nas proximidades, além de descargas de efluentes domésticos e industriais na zona estuarina da Lagoa e também atividades de pesca e recreação são realizadas naquele ambiente. Os autores salientaram que habitats aquáticos com forte ação antrópica são ambientes ideais para a disseminação de resistência antimicrobiana. De um modo geral, os resultados apresentados pelos autores mencionados são em grande parte consistentes com os resultados do presente estudo, pois ainda que se tratem de gêneros diferentes, indicam que ambientes aquáticos podem atuar como reservatórios de genes de resistência.

Quando analisado o percentual de isolados de *P. aeruginosa* obtidos das amostras que receberam o tratamento, pode-se observar um maior número de isolados resistentes quando comparados aos isolados das amostras sem tratamento. Todavia, as percentagens de resistência superiores a 70% estiveram relacionadas aos antimicrobianos amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima e cotrimoxazol. Também foram observados nesses isolados uma baixa percentagem de resistência para amicacina, gentamicina, ceftazidima, cefepima, ciprofloxacina, norfloxacin, imipenem e piperacilina-tazobactam. A sensibilidade em todos os isolados foi observada para amicacina e piperacilina-tazobactam no ponto 2 e para cefepima no ponto 4. Embora a resistência a piperacilina-tazobactam tenha sido relativamente baixa (6,9%) comparada aos antimicrobianos que exibiram percentuais acima de 70%, a resistência a esse antimicrobiano indica a possível presença de metalcarbapenemases nesses isolados, uma vez que o tazobactam inibe as  $\beta$ -lactamases das classes A, D e C.

De uma maneira geral, pode-se verificar que o percentual de isolados resistentes com o tratamento das amostras aumentou, mesmo para aqueles que exibiram percentuais acima de 70% comparado com os percentuais dos isolados das amostras sem o tratamento, com exceção dos antimicrobianos aztreonam, cefotaxima, ertapenem e cloranfenicol, este resultado é esperado uma vez que a presença do antimicrobiano seleciona cepas resistentes em detrimento das sensíveis. A resistência exibida aos demais antimicrobianos tais como: imipenem, gentamicina, amicacina, ciprofloxacina, norfloxacina, piperacilina-tazobactam, cefepima e ceftazidima, quando receberam o tratamento manteve-se baixa, no entanto, aumentou, comparada aos isolados obtidos das amostras sem o tratamento, sendo assim, o tratamento das amostras com antimicrobianos revelou uma percentagem maior de isolados resistentes (FIGURA 4).

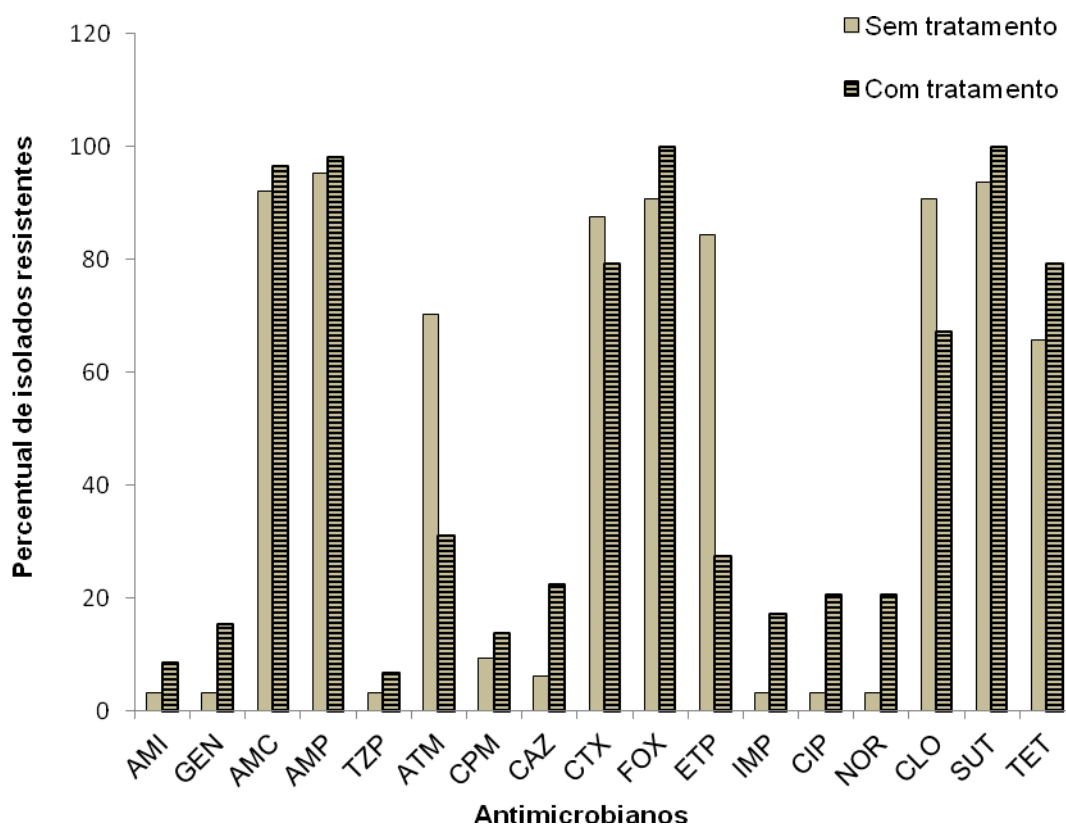


FIGURA 4: Percentual de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* quando submetidos ao teste de disco difusão. AMI: amicacina, AMC: amoxicilina-ácido clavulânico, AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CPM: cefepima, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FOX: cefoxitina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ETP: ertapenem, GEN: gentamicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacina, TZP: piperacilina-tazobactam, SUT: sulfametoxazol-trimetoprima, TET: tetraciclina.

De um modo geral, mesmo para os antimicrobianos com baixa porcentagem de resistência o número de isolados resistentes obtidos com o tratamento das amostras foi maior e mais distribuído entre os pontos de coleta.

A porcentagem geral dos isolados multirresistentes (MDR) de *P. aeruginosa* das amostras não submetidas ao tratamento foi de 56,58%, sendo que os pontos 2 e 3 apresentaram os maiores valores. Enquanto que a porcentagem geral dos isolados multirresistentes de *P. aeruginosa* das amostras submetidas ao tratamento foi de 70,43% sendo que os pontos 1 e 3 apresentaram os maiores valores (TABELA 4). De uma maneira geral o tratamento com os antimicrobianos revelou um maior percentual de isolados multirresistentes. No entanto, no ponto 2 (com tratamento comparado aquele sem tratamento) houve uma diminuição de MDR, ou seja, o tratamento deve ter afetado o aparecimento de MDR nesse ponto.

Os isolados de *P. aeruginosa* foram agrupados em 55 perfis de susceptibilidade a antimicrobianos. Entre esses, 27 perfis foram considerados de multirresistência (perfis 16, 17, 19, 20, 25, 26, 28, 29, 30, 34, 35, 37, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 e 55, TABELA 5). Observou-se que o perfil 34 (AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET) apresentou o maior número de isolados e foi comum para ambas as amostras sem tratamento e com tratamento. Os perfis 21, 28 e 30 também foram encontrados em ambas as amostras, no entanto, em pontos de coleta diferentes. Os padrões exibidos nas amostras não submetidas ao tratamento e também encontrados com o tratamento indicam que na Laguna já estão presentes *P. aeruginosa* com esses perfis de resistência. O tratamento está apenas selecionando microrganismos com os perfis citados.

Os perfis 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 25, 28, 38, 39, 40, 46, 49, 50, 51, 52, 53, 54 e 55 foram encontrados somente nas amostras submetidas ao tratamento com os antimicrobianos, sendo que destes, 6 perfis (12, 29, 50, 51, 53 e 54) foram encontrados exclusivamente no Ponto 3. O perfil 20 (AMC, AMP, CTX, FOX, CLO, SUT, TET) foi encontrado em todos os pontos de coleta apenas nas amostras submetidas ao tratamento. Os demais perfis variaram entre os pontos de coleta. Pode-se observar que a grande maioria dos perfis de resistência exibidos estiveram relacionados aos  $\beta$ -lactâmicos e a multirresistência aos  $\beta$ -lactâmicos acompanhado de cloranfenicol, cotrimoxazol e tetraciclina. Alguns perfis também exibiram

multirresistência as classes acima citadas somado a resistência as quinolonas e aminoglicosídeos (perfis 45, 47, 49, 50 e 51).

Schwartz et al. (2014) afirma que a multirresistência em *P. aeruginosa* é ocasionada por uma combinação de baixa permeabilidade da membrana externa, bombas de efluxo e genes de resistência codificados cromossomicamente e também aliados ao potencial de desenvolver resistência através de mutações e adquirir genes de resistência por meio de transferência horizontal de genes. Bonomo e Szabo (2006) dizem que o sistema de efluxo MexAB-OprM constitutivamente expresso em *P. aeruginosa* contribui para a resistência intrínseca as tetraciclinas, cotrimoxazol, fluoroquinolonas e também aos  $\beta$ -lactâmicos, tais como: penicilinas e cefalosporinas. A susceptibilidade aos aminoglicosídeos não é afetada pelo sistema de efluxo MexAB-OprM, no entanto, pode ser afetada pelo sistema de efluxo MexXY-OprM (BONOMO & SZABO, 2006).

A presença de integrons também pode contribuir para a multirresistência em bactérias Gram-negativas e estas estruturas são bastante frequentes em *P. aeruginosa* (NIKOKAR et al., 2013; SPINDLER et al., 2012). Esses determinantes genéticos são caracterizados por conter genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, tais como os aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos, cloranfenicol e também ao cotrimoxazol. Além disso, nessas estruturas também são encontrados genes que conferem resistência aos desinfetantes e antisépticos (ANTUNES et al., 2006).

A presença dos perfis citados encontrados apenas com o tratamento das amostras, demonstram que se realmente estivessem presentes agentes antimicrobianos na Laguna de Tramandaí, estes isolados com os presentes perfis, muitos deles associados a multirresistência estariam sendo selecionados. Infelizmente, não foi realizada a análise das amostras de água quantificando os agentes antimicrobianos que pudessem estar presentes no local, o que poderia contribuir para a análise dos resultados.

TABELA 5: Perfil de multirresistência a antimicrobianos em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* obtidas de amostras de água superficial com e sem tratamento com antimicrobianos.

Perfil de multirresistência	Número de isolados							
	P1		P2		P3		P4	
	*ST	CT	ST	CT	ST	CT	ST	CT
1 - TET	0	0	0	0	1	0	0	0
2 - CIP, SUT	1	0	0	0	0	0	0	0
3 - ATM, CLO	0	0	1	0	0	0	0	0
4 - AMC, AMP, TET	0	0	0	0	0	0	1	0
5 - AMC, AMP, FOX, SUT	0	0	0	2	0	0	0	1
6 - AMP, CTX, FOX, SUT	0	0	0	0	0	0	0	1
7 - FOX, CIP, NOR, SUT	0	0	0	0	0	1	0	1
8 - AMC, AMP, FOX, CLO	0	0	0	0	0	1	0	0
9 - AMC, AMP, FOX, CLO, SUT	0	1	0	0	0	0	0	1
10 - AMC, AMP, CAZ, FOX, SUT	0	0	0	0	0	1	0	1
11 - AMC, AMP, FOX, SUT, TET	0	1	0	0	0	1	0	0
12 - AMC, AMP, CTX, FOX, SUT	0	0	0	0	0	1	0	0
13 - AMC, AMP, FOX, IMP, SUT, TET	0	0	0	0	0	0	1	0
14 - AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, ETP	0	0	0	0	1	0	0	0
15 - AMC, AMP, CTX, FOX, CLO, SUT	0	0	1	0	1	0	0	0
16 - AMC, AMP, FOX, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	0	0	0	1
17 - AMP, CTX, FOX, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	1	0	0	0
18 - AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, ETP, SUT	0	0	0	0	0	0	1	0
19 - AMC, AMP, ATM, ETP, CLO, SUT, TET	0	0	1	0	0	0	0	0
20 - AMC, AMP, CTX, FOX, CLO, SUT, TET	0	2	0	2	0	1	0	3
21 - AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, CLO, SUT	0	0	0	0	1	1	1	0
22 - AMC, AMP, TZP, ATM, FOX, ETP, CLO	1	0	0	0	0	0	0	0
23 - AMC, AMP, ATM, CTX, ETP, CLO, SUT	1	0	0	0	0	0	0	0
24 - AMC, AMP, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT	0	0	1	0	1	0	0	0
25 - AMC, AMP, CTX, FOX, NOR, CLO, SUT	0	1	0	0	0	0	0	0
26 - AMP, ATM, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	1	0	0	0	0	0	0	0
27 - AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT	4	0	2	0	0	0	0	0

28 - AMC, AMP, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	0	1	2	2	2	2	2	3
29 - AMC, AMP, CTX, FOX, CIP, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	0	1	0	0
30 - AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, CLO, SUT, TET	0	2	3	1	0	3	0	1
31 - AMC, AMP, TZP, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT	0	0	0	0	1	0	0	0
32 - AMC, AMP, CAZ, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT	1	0	0	0	0	0	0	0
33 - AMC, AMP, ATM, CAZ, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT	1	0	0	0	0	0	0	0
34 - AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	7	2	5	0	3	0	2	0
35 - AMC, AMP, CPM, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	1	0	0	0	0	0	0	0
36 - AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, FOX, ETP, SUT, TET	1	0	0	0	0	0	0	0
37 - AMP, ATM, CPM, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	1	0	0	0	0	0	0	0
38 - AMC, AMP, TZP, ATM, CAZ, CTX, FOX, SUT, TET	0	1	0	0	0	0	0	0
39 - AMC, AMP, ATM, CAZ, CTX, FOX, ETP, IMP, SUT	0	0	0	1	0	0	0	0
40 - AMC, AMP, ATM, CAZ, CTX, FOX, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	0	1	0	1
41 - AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, ETP, IMP, CLO, SUT	0	0	0	0	1	0	0	0
42 - GEN, AMC, AMP, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	1	0	0	0
43 - AMC, AMP, ATM, CAZ, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	1	0	0	0
44 - AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	1	0	0	0	0	0	1	0
45 - AMC, AMP, ATM, CPM, FOX, ETP, CIP, CLO, SUT, TET	1	0	0	0	0	0	0	0
46 - AMI, GEN, AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	0	0	0	1
47 - AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, ETP, NOR, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	1	0	0	0
48 - GEN, AMC, AMP, ATM, CAZ, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	0	0	1	0	0	0	0	0
49 - AMI, AMC, AMP, TZP, CTX, FOX, ETP, IMP, CIP, NOR, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	0	0	0	1
50 - AMI, GEN, AMC, AMP, CTX, FOX, ETP, IMP, CIP, NOR, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	0	1	0	0
51 - AMC, AMP, TZP, ATM, CPM, CTX, FOX, ETP, CIP, NOR, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	0	1	0	0
52 - GEN, AMC, AMP, CPM, CAZ, CTX, FOX, ETP, IMP, CIP, NOR, CLO, SUT	0	0	0	1	0	0	0	0
53 - GEN, AMC, AMP, CPM, CAZ, CTX, FOX, ETP, IMP, CIP, NOR, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	0	4	0	0
54- AMI, GEN, AMC, AMP, CPM, CAZ, CTX, FOX, ETP, IMP, CIP, NOR, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	0	1	0	0
55 - AMI, GEN, AMC, AMP, TZP, ATM, CPM, CAZ, CTX, FOX, ETP, IMP, CIP, NOR, CLO, SUT, TET	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>Total de isolados</b>	<b>22</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>21</b>	<b>9</b>	<b>16</b>

Ponto 1: Foz do estuário. Ponto 2: Trapiche de um condomínio horizontal de Imbé, ponto interno da Laguna. Ponto 3: Centro da Laguna. Ponto 4: margem da Laguna com urbanização ausente.\*ST: Sem tratamento. CT: Com tratamento. AMI: amicacina, AMC: amoxicilina-ácido clavulânico, AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CPM: cefepima, CTX: cefotaxima, FOX: cefoxitina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ETP: ertapenem, GEN: gentamicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacina, TZP: piperacilina-tazobactam, SUT: sulfametoxazol-trimetoprima, TET: tetraciclina.

De acordo com alguns estudos, *P. aeruginosa* resistentes são descarregados continuamente em corpos de água principalmente através de esgoto. No corpo de água afetado a resistência pode ser adquirida por meio do contato entre os isolados de *P. aeruginosa* provenientes do esgoto sobre o impacto prolongado dos antimicrobianos presentes ou na ausência dos mesmos, já que a transferência horizontal de genes independe da presença do agente antimicrobiano em corpos de água, no entanto, os resíduos de antimicrobianos podem acelerar os processos de transferência horizontal de genes (KUMERER, 2004; OLGA et al., 2016).

Como visto acima, alguns dos perfis foram encontrados apenas no Ponto 3, isso indica que o desague de água oriundos do Rio Tramandaí, no qual também se conectam outros rios que fazem parte da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, podem estar depositando na Laguna bactérias resistentes. Um fato que não pode ser desconsiderado seria que nesses rios podem estar sendo liberados esgotos que através das correntes de água possam contribuir para a presença de microrganismos resistentes na Laguna de Tramandaí, além disso, o Rio Grande do Sul é caracterizado por ser um dos Estados Brasileiros que contribui fortemente na economia do país com suas plantações agrícolas e atividades pecuárias. A nível ambiental tais atividades podem influenciar na resistência bacteriana, uma vez que o uso de antimicrobianos e também agrotóxicos, entre outras substâncias contribui para a contaminação do solo e conseqüentemente de ambientes aquáticos. De uma maneira geral não apenas os efluentes domésticos mas também atividades agrícolas e pecuárias ocasionam a contaminação de ambientes aquáticos e seleção de microrganismos resistentes.

Em um estudo, Rocha et al. (2015) encontraram *Pseudomonas* spp. com perfil de resistência aos antimicrobianos ampicilina, ceftazidima, cefepima, ertapenem, imipenem, amicacina, gentamicina, piperacilina/tazobactam entre outros, em amostras de água do córrego Água Boa localizado no município de Dourados no Mato Grosso do Sul. O córrego foi caracterizado como um local impactado com atividades agrícolas, industriais e domésticas. Assim como no estudo, os autores encontraram *Pseudomonas* resistentes em um ambiente aquático que também recebe a influência de atividades agrícolas, indicando que tais atividades podem contribuir para a resistência microbiana no ambiente aquático, pois, os pesquisadores encontraram nas amostras de água metais pesados que segundo

eles podem estar relacionados as atividades agrícolas que são realizadas nas proximidades do córrego.

Os maiores percentuais de resistência (acima de 70%) entre os isolados de *Acinetobacter* sp. provenientes de amostras não submetidas ao tratamento estiveram relacionados a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico no ponto 4 e a tetraciclina nos pontos 2, 3 e 4 (TABELA 6). Os demais antimicrobianos mostraram percentuais entre 8,33% (amicacina e norfloxacina) e 41,66% (cloranfenicol, cefotaxima, ertapenem e sulfametoxazol-trimetoprima). Para alguns deles todos os isolados foram sensíveis. Não foi possível analisar a resistência média por ponto devido ao baixo número de isolados.

TABELA 6: Percentual de *Acinetobacter* sp. resistentes e multirresistentes de amostras de água superficial submetidas ou não a tratamento com antimicrobianos, segundo os pontos de coleta da Laguna de Tramandai/RS.

Antimic.	Sem tratamento				Com tratamento		
	P1=3' n(%)	P2=3' n(%)	P3=4' n(%)	P4=2' n(%)	P2=3' n(%)	P3=7' n(%)	P4=3' n(%)
AMI	0	0	1(25)	0	1(33,3)	3(42,8)	3(33,3)
GEN	0	0	0	0	2(66,6)	4(57,1)	1(33,3)
CLO	1(33,3)	1(33,3)	2(50)	1(50)	0	3(42,8)	1(33,3)
AMC	1(33,3)	1(33,3)	1(25)	2(100)	3(100)	6(85,7)	3(100)
AMP	1(33,3)	1(33,3)	1(25)	2(100)	3(100)	6(85,7)	3(100)
TZP	0	0	0	0	2(66,6)	3(42,8)	3(100)
ATM	1(33,3)	2(66,6)	1(25)	0	3(100)	7(100)	3(100)
CAZ	0	1(33,3)	1(25)	0	0	1(14,3)	3(100)
CPM	0	0	0	0	1(33,3)	2(28,6)	3(100)
CTX	1(33,3)	2(66,6)	1(25)	1(50)	2(66,6)	5(71,4)	3(100)
FOX	1(33,3)	1(33,3)	1(25)	1(50)	3(100)	6(85,7)	3(100)
CIP	1(33,3)	1(33,3)	0	0	2(66,6)	3(42,8)	3(100)
NOR	0	1(33,3)	0	0	2(66,6)	3(42,8)	3(100)
ETP	1(33,3)	2(66,6)	1(25)	1(50)	3(100)	6(85,7)	3(100)
IMP	0	0	0	0	3(100)	6(85,7)	3(100)
SUT	2(66,6)	1(33,3)	1(25)	1(50)	2(66,6)	0	0
TET	2(66,6)	3(100)	4(100)	2(100)	2(66,6)	2(28,6)	2(66,6)
MRD	1(33,3)	1(33,3)	1(25)	1(50)	2(66,6)	2(28,6)	1(33,3)

<sup>1</sup>Numero total de isolados analisados. Ponto 1: Foz do estuário. Ponto 2: Trapiche de um condomínio horizontal de Imbé, ponto interno da Laguna. Ponto 3: Centro da Laguna. Ponto 4: margem da Laguna com urbanização ausente. \*Ponto 1: sem isolados resistentes ao tratamento. AMI: amicacina, AMC: amoxicilina-ácido clavulânico, AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CPM: cefepima, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FOX: cefoxitina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ETP: ertapenem, GEN: gentamicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacina, TZP: piperacilina-tazobactam, SUT: sulfametoxazol-trimetoprima, TET: tetraciclina. MDR: multirresistente



Stenstrom et al. (2016) coletaram amostras de água do município de Alice e Fort Beaufort na África do Sul com a intenção de avaliar a susceptibilidade de *Acinetobacter* frente aos antimicrobianos cloranfenicol, ciprofloxacina, imipenem, sulfametoxazol-trimetoprima e outros. Os pesquisadores verificaram que dos 86 isolados de *Acinetobacter* obtidos, 20% foram resistentes ao imipenem e sulfametoxazol-trimetoprima, 10% resistente ao cloranfenicol e dos isolados testados nenhum exibiu resistência a ciprofloxacina, diferentemente do presente estudo, pois, embora o número de isolados de *Acinetobacter* sp. tenha sido baixo comparado ao encontrado pelos pesquisadores mencionados, em nosso estudo, foram encontrados isolados de *Acinetobacter* sp. resistentes a ciprofloxacina em ambas as amostras (com e sem tratamento). Rocha et al. (2013) obteve de amostras de água potável e de torneiras residenciais *Acinetobacter* resistentes aos antimicrobianos ciprofloxacina, gentamicina, cotrimoxazol, tetraciclina e ceftazidima.

Ferreira et al. (2011) avaliaram a disseminação de resistência de *A. baumannii* em amostras de águas residuais hospitalares de três hospitais na cidade de Porto Alegre e através da análise da suscetibilidade 95,14% foram susceptíveis ao imipenem, 39,47% resistentes a amicacina, 40,26% a ceftazidima e 42,24% a ciprofloxacina. Em uma comparação com o presente estudo, pode-se observar que *Acinetobacter* sp. é mais frequente em amostras de águas residuais hospitalares do que em estuários, pois muitas vezes está associado a infecções hospitalares. No entanto, em nosso estudo, os isolados de *Acinetobacter* também exibiram resistência aos antimicrobianos amicacina, ceftazidima e ciprofloxacina, além disso, em nosso estudo, os isolados apresentaram percentuais de resistência acima de 70% (amostras com tratamento) ao imipenem diferentemente dos resultados obtidos pelos autores mencionados acima quanto a resistência ao imipenem.

Quando analisado o percentual de isolados de *Acinetobacter* sp. obtidos das amostras que receberam o tratamento, pode-se observar um maior número de isolados resistentes quando comparados aos isolados das amostras sem tratamento. Também pode-se observar que o percentual de resistência aumentou em todos os pontos de coleta para a maioria dos antimicrobianos, com exceção dos antimicrobianos cloranfenicol, ceftazidima e cotrimoxazol que não foram encontrados isolados resistentes com o tratamento das amostras em alguns pontos de coleta. De uma maneira geral, o número de isolados resistentes quando as amostras foram

submetidas ao tratamento foi também maior e mais distribuído entre os pontos de coleta, indicando que o tratamento com o imipenem favoreceu o aparecimento de isolados resistentes principalmente aos  $\beta$ -lactâmicos. A amostra que recebeu o tratamento com ceftazidima exibiu apenas 1 isolado no ponto 4, resistente a todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) e tetraciclina. De uma maneira geral, as amostras que receberam o tratamento com os antimicrobianos revelaram uma porcentagem maior de isolados resistentes, com exceção dos antimicrobianos cloranfenicol, cotrimoxazol e tetraciclina (FIGURA 5), resultado também esperado uma vez que a presença do antimicrobiano seleciona cepas resistentes.

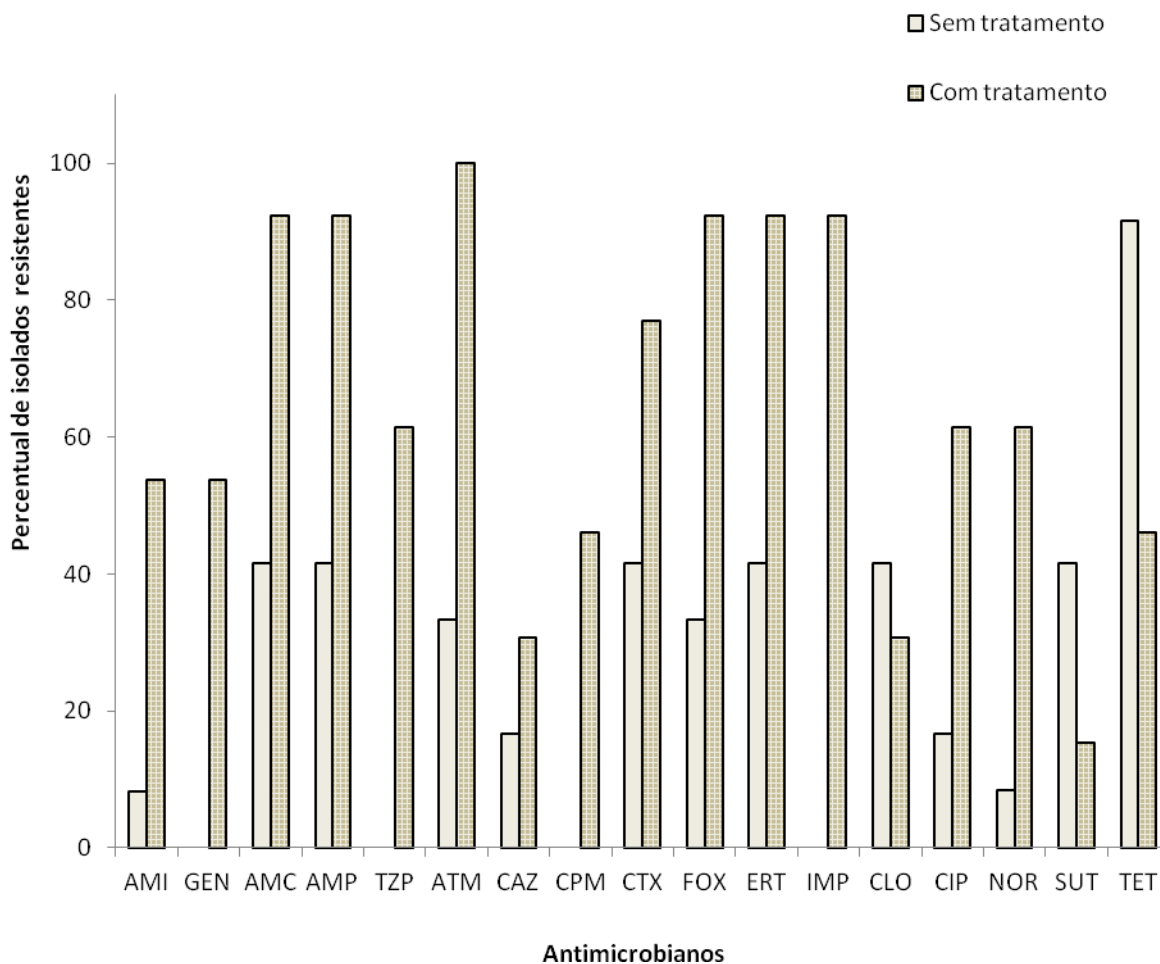


FIGURA 5: Percentual de resistência de *Acinetobacter* sp. quando submetidos ao teste de disco difusão. AMI: amicacina, AMC: amoxicilina-ácido clavulânico, AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CPM: cefepima, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FOX: cefoxitina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ETP: ertapenem, GEN: gentamicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacina, TZP: piperacilina-tazobactam, SUT: sulfametoxazol-trimetoprima, TET: tetraciclina.

A porcentagem geral dos isolados multirresistentes (MDR) de *Acinetobacter* sp. provenientes das amostras de água não submetidas ao tratamento com os antimicrobianos foi de 35,4%, sendo que o ponto 4 apresentou o maior valor. Enquanto que a porcentagem geral dos isolados multirresistentes de *Acinetobacter* sp. oriundos de amostras submetidas ao tratamento foi de 42,83% no qual o ponto 2 apresentou o maior valor (TABELA 6).

Os isolados de *Acinetobacter* sp. obtidos com e sem o tratamento das amostras foram agrupados em 20 perfis de susceptibilidade a antimicrobianos (TABELA 7). Destes, 7 perfis foram considerados de multirresistência (perfis 11, 12, 13, 16, 18, 19 e 20). Os perfis (6, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20) foram encontrados apenas com o tratamento das amostras, sendo que os perfis 8, 9, 10, 14 e 19 foram exclusivos do Ponto 3. Como discutido anteriormente, o Ponto 3 encontra-se no centro do Laguna onde acredita-se que ocorra a confluência de águas do Rio Tramandaí que podem estar contribuindo para a resistência.

A maioria dos perfis de resistência encontrados exibiram resistência principalmente aos  $\beta$ -lactâmicos juntamente com tetraciclina. Como já mencionado, a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos pode ser ocasionada pelas  $\beta$ -lactamases que hidrolizam o anel  $\beta$ -lactâmico dos antimicrobianos pertencentes a essa classe (HAMMOUDI et al., 2015). Aliado a isso, a baixa permeabilidade da membrana externa e as alterações nas PBPs tem contribuído para a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (VAN LOOVEREN et al., 2004; ZARRILLI et al., 2013). A resistência as tetraciclinas pode estar associada a uma bomba de efluxo conhecida como RND (resistência-nodulação-divisão) que também confere resistência a antimicrobianos de outras classes, tais como os aminoglicosídeos, as fluoroquinolonas e o cloranfenicol (VAN LOOVEREN et al., 2004). Os perfis 19 e 20 apresentaram resistência aos aminoglicosídeos, as fluoroquinolonas, ao cloranfenicol, juntamente com resistência a tetraciclinas e alguns  $\beta$ -lactâmicos, talvez a multirresistência esteja associada a essa bomba de efluxo.

O tratamento das amostras com os antimicrobianos ceftazidima e imipenem demonstra que se realmente esses antimicrobianos estivessem presentes na Laguna de Tramandaí selecionariam *Acinetobacter* sp. com esses perfis de resistência e multirresistência. Um dos isolados selecionado com o tratamento das amostras no Ponto 2 exibiu perfil de resistência apenas aos  $\beta$ -lactâmicos (perfil 6), o

tratamento com o imipenem deve ter selecionado esse isolado com resistência aos demais antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos.

Assim como em *P. aeruginosa* a resistência exibida pelo gênero *Acinetobacter* aos antimicrobianos, é caso de saúde pública, uma vez que algumas espécies que compõem os gêneros são causadoras de infecções hospitalares, tais como *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. A ampla disseminação de bactérias associadas a infecções hospitalares em águas superficiais é uma preocupação clínica e de saúde em todo o mundo. O uso de antimicrobianos na medicina humana, veterinária e pecuária, tem aumentado a resistência microbiana entre bactérias clinicamente importantes, que podem atuar como reservatórios de multirresistência em ambientes aquáticos facilitando a transmissão para animais e humanos que estão em contato com esse tipo de ambiente (TURANO et al., 2016).

Vários estudos demonstram que as estações de tratamento de águas residuais desempenham um importante papel na liberação de antimicrobianos, bactérias resistentes a antimicrobianos e genes de resistência no ambiente aquático. No entanto, ainda que ocorra a liberação de microrganismos resistentes através das estações de tratamento em corpos de água, a proporção é menor do que se os resíduos domésticos forem liberados diretamente no ambiente ou então nos corpos de água, pois nas estações de tratamento ocorrem diversos processos que visam diminuir os agentes antimicrobianos e também microrganismos nesses ambientes, uma vez que após o tratamento são liberados em corpos de água.

Os dados oficiais sobre a Laguna de Tramandaí, bem como sobre os municípios de Imbé e Tramandaí relatam que menos da metade do município de Tramandaí tem coleta e tratamento de esgotos e Imbé não possui coleta e tratamento de esgotos, também salientam sobre a possível liberação de esgotos clandestinos na Laguna, estes, por sua vez, se realmente estiverem sendo liberados no corpo hídrico, podem contribuir para a resistência bacteriana em uma proporção bem maior do que se esses resíduos domésticos estivessem sendo liberados em uma estação de tratamento por exemplo.

No ambiente aquático quando resíduos de antimicrobianos estão presentes em concentrações sub-inibitórias, eles tendem a acelerar os processos de mutações e também transferência horizontal de genes, pois estimulam mecanismos de respostas na célula bacteriana e assim, contribuem para a evolução da

resistência, nesses casos, as cepas sensíveis tendem a se tornar resistentes e com isso, auxiliam na propagação de resistência (SCHWARTZ et al., 2015).

O desenvolvimento de resistência bacteriana pode ser considerado uma resposta evolutiva na presença de uma pressão seletiva tal como os antimicrobianos. Em condições ideais, as bactérias se multiplicam rapidamente de minutos a horas e com isso mutações espontâneas podem ocorrer, e em qualquer população de bactérias ocorrerá naturalmente uma variação genética significativa. Quando as bactérias são expostas à droga em uma concentração menor do que a necessária para inibir o crescimento ou eliminá-las, as células que carregam determinantes de resistência têm uma vantagem seletiva na sobrevivência e crescimento sobre aqueles que não. Assim, as bactérias resistentes tornam-se mais predominantes por uma seleção natural darwiniana (ADACHI et al., 2013). Além das mutações, a transferência horizontal de genes contribui fortemente para a resistência bacteriana, pois ocorre com frequência dentro de reservatórios ambientais, locais onde bactérias e agentes antimicrobianos coexistem, e a população bacteriana é alta.

Nos últimos anos, o aparecimento de bactérias patogênicas multirresistentes tem colocado em risco a utilização dos antimicrobianos, pois muitas tem apresentado resistência a todos ou praticamente todos os antimicrobianos disponíveis atualmente, tornando os antimicrobianos ineficazes, levantando a hipótese de retorno à era pré-antibiótica, quando a medicina era ineficiente no combate a infecções (AL-BARRY et al., 2014).

A liberação generalizada de desinfetantes e produtos farmacêuticos relacionados às práticas agrícolas, médicas e veterinárias em corpos de água contribui fortemente para o surgimento de bactérias multirresistentes (MARTI et al., 2014; ADACHI et al., 2013). Assim, o solo, a água e outros habitats enriquecidos em nutrientes podem ser pontos quentes para a transferência horizontal de genes, resultando em multirresistência (WELLINGTON et al., 2013). Diante disso, percebe-se que o ambiente aquático em si, desempenha um papel importante na transferência e evolução de genes de resistência, principalmente quando são encontrados nele, resíduos de antimicrobianos, já que estes podem favorecer o aumento de resistência bacteriana.

### 5.3 Detecção de produção de ESBL

Dos 122 isolados de *P. aeruginosa* todos eles exibiram resistência a pelo menos uma cefalosporina de terceira geração. A triagem para a produção de ESBL de *P. aeruginosa*, mostrou que dos 64 isolados obtidos das amostras sem tratamento, 5 foram positivos para a produção de ESBL (7,81%) e dos 58 isolados obtidos das amostras com o tratamento, 5 foram positivos para o teste (8,62%). Dos 25 isolados de *Acinetobacter* sp., 5 isolados provenientes das amostras com tratamento foram considerados possíveis produtores de ESBL (38,46%).

Esses achados revelam a presença de beta lactamases de espectro estendido na Laguna de Tramandaí, sugerindo a possibilidade de transferência horizontal de genes, possivelmente por plasmídeos, uma vez que dois gêneros completamente diferentes exibiram isolados positivos para o teste fenotípico de produção de ESBL e sustentam nossa hipótese de que a liberação de resíduos de antimicrobianos no ambiente aquático seleciona bactérias resistentes e também pode favorecer a transferência horizontal de genes entre populações bacterianas.

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos são muito utilizados para o combate a doenças infecciosas e nos últimos anos a resistência as cefalosporinas têm se disseminado entre bactérias Gram-negativas (TACÃO et al., 2012). As ESBL são geralmente adquiridas por transferência horizontal de genes e conferem resistência as cefalosporinas de terceira geração. Muitas são mutantes das  $\beta$ -lactamases TEM ou SHV ou são mobilizados através de bactérias ambientais (WELLINGTON et al., 2013). Estudos demonstram a presença de ESBL no ambiente aquático, tais como rios, água do mar, água doce, águas residuais, água potável e também sistemas de distribuição (OLGA et al., 2016).

TABELA 7: Perfil de multirresistência a antimicrobianos em isolados de *Acinetobacter* sp. obtidos de amostras de água superficial com e sem tratamento com antimicrobianos.

Perfil de multirresistência	Número de isolados						
	*P1	P2		P3		P4	
	ST	ST	CT	ST	CT	ST	CT
1 – TET	1	1	0	2	0	0	0
2 – ATM	0	0	0	0	1	0	0
3 - CIP, SUT	1	0	0	0	0	0	0
4 - AMI, CLO, TET	0	0	0	1	0	0	0
5 - AMC, AMP, TET	0	0	0	0	0	1	0
6 - AMC, AMP, FOX, ATM, ETP, IMP	0	0	1	0	0	0	0
7 - ATM, CAZ, CTX, ETP, CIP, NOR, TET	0	1	0	0	0	0	0
8 - AMC, AMP, CTX, FOX, ATM, ETP, IMP, CIP	0	0	0	0	1	0	0
9 - GEN, AMC, AMP, CTX, FOX, ATM, ETP, IMP	0	0	0	0	1	0	0
10 - GEN, AMC, AMP, FOX, ATM, ETP, IMP, NOR	0	0	0	0	1	0	0
11 - AMC, AMP, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	0	0	0	0	0	1	0
12 - AMC, AMP, ATM, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	1	1	0	0	0	0	0
13 - AMC, AMP, ATM, CAZ, CTX, FOX, ETP, CLO, SUT, TET	0	0	0	1	0	0	0
14 - AMI, AMC, AMP, TZP, CPM, CTX, FOX, ATM, ETP, IMP, CLO	0	0	0	0	1	0	0
15 - AMC, AMP, TZP, CPM, CAZ, CTX, FOX, ATM, ETP, IMP, CIP, NOR	0	0	0	0	0	0	1
16 - GEN, AMC, AMP, TZP, CTX, FOX, ATM, ETP, IMP, CIP, NOR, SUT, TET	0	0	1	0	0	0	0
17 - AMC, AMP, TZP, CPM, CAZ, CTX, FOX, ATM, ETP, IMP, CIP, NOR, TET	0	0	0	0	0	0	1
18 - AMI, GEN, AMC, AMP, TZP, CPM, CTX, FOX, ATM, ETP, IMP, CIP, NOR, CLO, TET	0	0	1	0	1	0	0
19 - AMI, GEN, AMC, AMP, TZP, CAZ, CTX, FOX, ATM, ETP, IMP, CIP, NOR, CLO, TET	0	0	0	0	1	0	0
20 - AMI, GEN, AMC, AMP, TZP, CPM, CAZ, CTX, FOX, ATM, ETP, IMP, CIP, NOR, CLO, TET	0	0	0	0	0	0	1
Total de isolados	3	3	3	4	7	2	3

Ponto 1: Foz do estuário. Ponto 2: Trapiche de um condomínio horizontal de Imbé, ponto interno da Laguna. Ponto 3: Centro da Laguna. Ponto 4: margem da Laguna com urbanização ausente. \*P1 não apresentou isolados nas amostras com tratamento. ST: Sem tratamento. CT: Com tratamento. AMI: amicacina, AMC: amoxicilina-ácido clavulânico, AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CPM: cefepima, CTX: cefotaxima, FOX: cefoxitina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ETP: ertapenem, GEN: gentamicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacin, TZP: piperacilina-tazobactam, SUT: sulfametoxazol-trimetoprima, TET: tetraciclina.

Tacão et al. (2012) coletaram amostras de água de 12 locais em 11 rios integrantes da Bacia Hidrográfica do Rio Volga localizado no centro de Portugal, caracterizados pela exposição a várias atividades antrópicas de origem doméstica, industrial e agrícola e verificaram a produção de ESBL dos isolados obtidos de um tratamento de amostras de água com ceftazidima. Assim como na presente pesquisa, foram encontrados nas amostras de água dos rios *Pseudomonas* e *Acinetobacter* sp. produtores de ESBL.

Como visto no presente trabalho, foram encontrados isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp. resistentes a diversos antimicrobianos e também produtores de ESBL. Esses isolados podem contribuir para a disseminação de resistência no ambiente aquático, além disso, também podem colocar em risco a saúde da população local, uma vez que a água da Laguna é utilizada para recreação e atividades de pesca. A preocupação estende-se a nível regional e estadual, devido a movimentação das águas que ocorrem na Laguna de Tramandaí (trocas de águas fluviais e marinhas), cujos microrganismos resistentes podem estar se deslocando com as correntes de água. Além disso, as práticas agrícolas e pecuárias também podem influenciar na contaminação da Laguna, colocando em risco não apenas a população local mas também a população visitante dos municípios, inclusive os banhistas que utilizam as praias ali existentes para lazer.

Por fim, através dos levantamentos feitos sobre a Laguna de Tramandaí, pode-se inferir que a mesma atua como reservatório de fatores de resistência a antimicrobianos e pode agir como uma rota de disseminação de resistência. A possível contaminação desse ambiente com antimicrobianos pode influenciar na permanência de resistência na Laguna de Tramandaí e conseqüentemente na disseminação de resistência entre as águas fluviais e marinhas.



## 6. CONCLUSÃO

Das amostras de água da Laguna de Tramandaí foi possível obter 846 isolados bacterianos, sendo que destes, 503 foram provenientes de amostras de água submetidas ao tratamento com antimicrobianos. Portanto, a possível presença de antimicrobianos na Laguna de Tramandaí poderia contribuir para a permanência de cepas resistentes a antimicrobianos nesse ambiente.

Foram identificados através de MALDI-TOF 122 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e 25 isolados de *Acinetobacter* por meio de provas bioquímicas. Os isolados de *P. aeruginosa* exibiram 55 perfis de resistência e os isolados de *Acinetobacter* exibiram 20 perfis de resistência aos antimicrobianos. Foram encontrados em ambos os gêneros isolados produtores de ESBL, sendo que *P. aeruginosa* exibiu 7,81% dos isolados com fenótipo de ESBL e foram provenientes das amostras sem o tratamento, enquanto que 8,62% foram obtidos das amostras com o tratamento. *Acinetobacter* sp. exibiu 38,46% originados de amostras com tratamento.

Diante dos resultados do presente estudo torna-se necessário o monitoramento contínuo de amostras de água da Laguna de Tramandaí, uma vez que ela pode ser considerada um reservatório de fatores de resistência e conseqüentemente rota de disseminação ambiental de resistência a antimicrobianos no ambiente aquático.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI F, YAMAMOTO A, TAKAKURA K, KAWAHARA R. 2013. Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*. 444:508–514

AHMED S, MAHBUB KR, AHMED MM, RAHMAN M, HOQUE MM. 2014. Microbiological Quality of Street Vended Drinking Water in Dhaka City and Screening for Antibiotics Resistance of Isolated *Salmonella spp* and *Pseudomonas spp*. *Journal of Scientific Research*. 6(2):359-371

AL-BAHRY SN, MAHMOUD IY, PAULSON JR, AL-MUSHARAFI SK. 2014. Antibiotic resistant bacteria in terrestrial and aquatic environments: A review. *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*. 4(3)1:11.

ALDRED KJ, KERNS RJ, OSHEROFF N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *American Chemical Society*. 53:1565–1574.

ALONSO A, SANCHEZ P, MARTINEZ JL. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*. 3(1):1-9.

ALOUACHE S, KADA M, MESSAI Y, ESTEPA V, TORRES C, BAKOUR R. 2012. Antibiotic Resistance and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Isolated Bacteria from Seawater of Algiers Beaches (Algeria). *Microbes and Environments*. 27(1):80–86.

ALVAREZ-VASQUEZ MA, PREGO R, OSPINA-ALVAREZ N, CAETANO M, BERNARDEZ P, DOVAL M, FILGUEIRAS AV, VALE C. 2016. Anthropogenic changes in the fluxes to estuaries: Wastewater discharges compared with river loads in small rias. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 179:112-123.

AMINOV RI, MACKIE RI. 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Letters*. 271:147–161.

ANTUNES P, MACHADO J, PEIXE L. 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58:297–304.

ATROUNI AA, GUILLOU MLJ, HAMZE M, KEMPF M. 2016. Reservoirs of non-baumannii *Acinetobacter* species. *Frontiers in Microbiology*. 7 (49):1-12.

BAKER-AUSTIN C, WRIGHT MS, STEPANAUSKAS R, MCARTHUR JV. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*. 14:176–182.

BAQUERO F, MARTÍNEZ JL, CANTÓN R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 19:260–265.

BAUMANN P. 1968. Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *Journal of Bacteriology*. 96(1):39-42

BAUMANN P, DOUDOROFF M, STANIER RY. 1968. A Study of the Moraxella Group. II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology*. 95(5):1520-1541.

BAZYLEU A, KUMAR A. Incubation temperature, osmolarity, and salicylate affect the expression of resistance–nodulation–division efflux pumps and outer membrane porins in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T. 2014. *FEMS Microbiol Letters*. 357: 136–143.

BÉRÉZIN EB, TOWNER KJ. 1996. *Acinetobacter* sp. as nosocomial pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clinical Microbiology Reviews*. 9(2):148–165.

BHUSHAN A, JOSHI J, SHANKAR P, KUSHWAH J, RAJU SC, PUROHIT HJ, KALIA VC. 2013. Development of Genomic Tools for the Identification of Certain *Pseudomonas* up to Species Level. *Indian Journal of Microbiology*. 53(3):253–263.

BOECKEL TPV, BROWERB C, GILBERTC M, GRENFELLA BT, LEVIN SA, ROBINSON TP, TEILLANT A, LAXMINARAYAN R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Sciences Agricultural*. 112(18):5649–5654.

BONOMO AB, SZABO D. 2006. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*. 43:S49–56

BOUKI C, VENIERI D, DIAMADOPOULOS E. 2013. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 91:1–9.

BOUVET PJM, GRIMONT PAD. 1987. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiology*. 138:569-578.

BREIDENSTEIN EBM, NÚÑEZ CLF, HANCOCK REW. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*. 19(8):419-426.

BUSH, K. 2010. Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical care*, 14(224):1-8.

BUYLLA AA, CULEBRAS E, PICAZO ECJ. 2012. Identification of *Acinetobacters* species: Is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infection, Genetics and Evolution Journal*. 12:345-349.

CALDERA L, FRANZETTI L, COILLIE EV, DE VOS P, STRAGIER P, DE BLOCK J, HEYNDRICKX M. 2016. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*. 54:142-153.

CAMP C, TATUM OL. 2010. A Review of *Acinetobacter baumannii* as a highly successful pathogen in times of war. *Labmedicine*. 14(1):649-657.

CAMPELLO FD. 2006. A problemática da poluição por esgotos domésticos no sistema estuarino-lagunar Tramandaí-Armazém (RS, Brasil): Física e Química da água e a resposta dos macroinvertebrados bentônicos. 194f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ecologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CANAL N, MENEGHETTI KL, ALMEIDA CP, BASTOS MR, OTTON LM, CORÇÃO G. 2016. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47: 337–344.

CANTÓN R, COQUE TM. 2006. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*. 9:466–475.

CAREY RO, MIGLIACCIO KW. 2009. Contribution of wastewater treatment plant effluents to nutrient dynamics in aquatic systems: a review. *Environmental Management*. 44:205-217.

CARVALHO AA, CARDOSO LL, NOGUEIRA HS, MENEZES EV, XAVIER MAS, BARRETO NAP, FERNANDES LF, XAVIER AREO. 2016. Characterization and molecular epidemiology of extensively prevalent nosocomial isolates of drug-resistant *Acinetobacter* sp. *Genetics and Molecular Research*. 15(3):1-11.

CHEN Z, LIU W, ZHANG Y, LI Y, JIAN Z, DENG H, ZOU M, LIU Y. 2013. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from XiangYa Hospital, in Hunan Province, China. *Journal of Basic Microbiology*. 53:121-127.

CHENG M, WU L, HUANG Y, LUO Y, CHRISTIE P. 2014. Total concentrations of heavy metals and occurrence of antibiotics in sewage sludges from cities throughout China. *Journal of Soils and Sediments*. 14:1123–1135.

CHUKWUDI CU. 2016. rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the Tetracyclines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60(8):443-4441.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. Performance Standards for Susceptibility Testing, M100eS20. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.

D' COSTA VM, KING CE, KALAN L, MORAR M, SUNG WWL, SCHWARZ C, FROESE D, ZAZULA G, CALMELS F, DEBRUYNE R, GOLDING GB, POINAR HN, WRIGHT GD. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 22:477-4 5 7.

DAGHRIR R, DROGUI P. 2013. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 11:209–227.

DHILLON RH, CLARK J. 2012. ESBLs: A Clear and Present Danger? *Critical Care Research and Practice*. 22:1-11.

DOUGHARI HJ, NDAKIDEMI PA, HUMAN IS, BENADE S. The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* sp.: An Overview. 2011. *Microbes and Environments*. 26(2):101–112.

FAJARDO A, MARTÍNEZ JL. 2008. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opinion in Microbiology*. 11:161-167.

FERNANDEZ L, GOODERHAM WJ, BAINS M, McPHEE JB, WIEGAND I, HANCOCK REW. 2010. Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component

regulatory system parR-ParS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(8):3372–3382.

FERNANDEZ L, BREIDENSTEIN EBM, HANCOCK REW. 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates* 14:1–21.

FERREIRA AE, MARCHETTI DP, OLIVEIRA LMD, GUSATTI CS, FUENTEFRIA DB, CORÇÃO G. 2011. Presence of OXA-23-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Wastewater from Hospitals in Southern Brazil. *Microbial Drug Resistance*. 17(2):221-227.

FERRONI A, GAUDELUS SI, ABACHIN E, QUESNE G, LENOIR G, BERCHE P, GAILARD JL. 2002. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(10):3793-7.

FUENTEFRIA DB, FERREIRA AE, CORÇÃO G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related? 2011. *Journal of Environmental Management*. 92:250-255

FUENTES S, DING GC, CÁRDENAS F, SMALLA K, SEEGER M. 2015. Assessing environmental drivers of microbial communities in estuarine soils of the Aconcagua River in Central Chile. *FEMS Microbiology Ecology*. 91(10):1-12.

GALÁN JC, CANDELAS FG, ROLAIN JM, CANTÓN R. 2013. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the  $\beta$ -lactamases world. *Frontiers in Microbiology*. 4(9):1-17.

GALLINI A, TABOULET F, BOURREL R. Regional variations in quinolone use in France and associated factors. 2012. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 31:2911–2918.

GILAD J, CARMELI Y. 2008. Treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter* species. *Drugs*. 68:165–189.

GILLINGS MR, STOKES HW. 2012. Are humans increasing bacterial evolvability? *Trends in Ecology and Evolution*. 27(6):346-352.

GIRLICH D, POIREL L, NORDMANN P. 2010. First Isolation of the *bla*OXA-23 Carbapenemase gene from an Environmental *Acinetobacter baumannii* Isolate. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 54(1):578–579.

GOMILA M, PEÑA A, MULET M, LALUCAT J, VALDÉS EG. 2014. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*. 6(214):1-13.

GONÇALVES RS, D'INCAO F. 2016. Perfil socioeconômico e laboral dos pescadores artesanais de camarão-rosa no complexo estuarino de Tramandaí (RS), BRASIL. *Boletim do Instituto de Pesca*. 42(2):387-401.

GUARDABASSI L, DALSGAARD A, OLSEN JE. 1999. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *Journal of Applied Microbiology*. 87:659–667.

GUARDABASSI L, DALSGAARD A, RAFFATELLU M, OLSEN JE. 2000. Increase in the prevalence of oxolinic acid resistant *Acinetobacter* spp. observed in a stream receiving the effluent from a freshwater trout farm following the treatment with oxolinic acid-medicated feed. *Aquaculture* 188, 205–218.

HAMMOUDI D, MOUBARECK CA, HAKIME N, HOUMANI M, BARAKAT A, NAJJAR Z, SULEIMAN M, FAYAD N, SARRAF R, SARKIS DK. 2015. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. *International Journal of Infection. Dis*. 36: 56-61.

HARNISZ M. 2013. Total resistance of native bacteria as an indicator of changes in the water environment. *Environmental Pollution*. 174:85-92.

HARNISZ M, GOŁÁS I, PIETRUK M. 2011. Tetracycline-resistant bacteria as indicators of antimicrobial resistance in protected waters—The example of the Drwęca River Nature Reserve (Poland). *Ecological Indicators*. 11:663–668.

HARNISZ MA, KORZENIEWSKA EA, CIESIELSKI SB, GOLAŚ I. 2015. tet Genes as indicators of changes in the water environment: relationships between culture-dependent and culture-independent approaches. *Science of the total environment*. 505:704–711.

HIGGINS PG, DAMMHAYN C, HACKEL M, SEIFERT H. 2010. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65:233–238.

HONG PY, AL-JASSIM N, ANSARI MI, MACKIE RI. 2013. Environmental and Public Health Implications of Water Reuse: Antibiotics, Antibiotic Resistant Bacteria, and Antibiotic Resistance Genes. *Antibiotics*. 2:367-399.

HRABÁK J, CHUDÁČKOVÁ E, WALKOV R. 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI- TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(1):103–114.

IBGE. Censo demográfico 2016. Disponível em << <http://cidades.ibge.gov.br/>>>. Acesso em: 27 de dez. de 2016.

IGBINOSA IH, IGBINOSA E. 2015. The Pseudomonads as a versatile opportunistic pathogen in the Environment. *A Batalha Contra Patógenos Microbianos: Ciência Básica, Avanços Tecnológicos e Programas Educacionais*. 821-831.

JANDA JM, ABBOTT SI. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9):2761 – 2764.

KHANOLKAR D, DUBEY SK, NAIK MM. 2015. Tributyltin Chloride (TBTCI)-Enhanced Exopolysaccharide and Siderophore Production in an Estuarine *Alcaligenes faecalis* Strain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 68:612–621.

KHOSRAVI AD, SADEGHI P, SHAHRAKI AH, HEIDARIEH P, SHEIKHI N. 2015. Molecular Methods for Identification of *Acinetobacter* Species by Partial Sequencing of the *rpoB* and 16S rRNA Genes. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 9(7):9-13.

KOHANSKI MA, DWYER DJ, COLLINS J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews*. 8:423-435.

KONG KF, SHNEPER L, MATHHE K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. 2009. *Journal Compilation*. 118:1-36.

KUMERER, K. 2003. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:5–7.



KUMMERER K. 2004. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54:311–320.

KUMMERER K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*.75: 417–434.

LACHMAYR KL, KERKHOF LK, DIRIENZO AG, CAVANAUGH CM, FORD TE. Quantifying Nonspecific TEM  $\beta$ -Lactamase (*bla*TEM) Genes in a Wastewater Stream. 2009. *Applied And Environmental Microbiology*. 75(1):203–211.

LAXMINARAYAN R, DUSE A, WATTAL C, ZAIDI AKM, WERTHEIM HFL, SUMPRADIT N, Vlieghe E, HARA GL, GOULD IM, GOOSSENS H, GREKO C, SO AD, BIGDELI M, TOMSON G, WOODHOUSE W, OMBAKA E, PERALTA AQ, QAMAR FN, MIR F, KARIUKI S, BHUTTA ZA, COATES A, BERGSTROM R, WRIGHT GD, BROWN ED, CARS O. 2013. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases Commission*. 13:1057-1098.

LI AB, ZHANG AX, GUO AF, WEIMIN WUB, ZHANG AT. 2013. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis. *Water research*. 47:4207-4216.

LI L, AL-SOUD WA, BERGMARK L, RIBER L, HANSEN LH, MAGID J, SØRENSEN SJ. 2013. Investigating the Diversity of *Pseudomonas* spp. in Soil Using Culture Dependent and Independent Techniques. *Current Microbiology*. 67:423–430.

LI W, ATKINSON GC, THAKOR NS, ALLAS U, LU C, CHAN KY, TENSON T, SCHULTEN K, WILSON KS, HAURYLIUK V, FRANK J. 2013. Mechanism of Tetracycline Resistance by Ribosomal Protection Protein Tet(O). *Nature Communications*. 4:1-17.

LIU YH, KUO SC, LEE YT, CHANG ICY, YANG SP, CHEN TL, FUNG CP. 2012. Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in GyrA and ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 45:108-112.

LIVERMORE DM. 2002. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases*. 34:634–40.

LLARRULL LI, TESTERO AS, FISHER JF, MOBASHERY S. 2010. The future of the  $\beta$ -lactams. *Current Opinion in Microbiology*. 13:551–557.

LUCZKIEWICZ A, KOTLARSKA E, WOJCIECH A, TARASEWICZ K, FUDALA-KSIAZEK S. 2015. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environmental Science and Pollution Research*. 22:19823-19834.

MANDEL M. 1966. Deoxyribonucleic acid base composition in the genus *Pseudomonas*. *Journal of General Microbiology*. 43(2):273-92.

MANAIA CM, MACEDO G, KASSINOS DF, NUNES OC. 2016. Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100:1543–1557.

MANIVASAGAN P, RAJARAM G, S. RAMESH, S. ASHOKKUMAR, AND P. DAMOTHARAN. 2011. Occurrence and seasonal distribution of antibiotic resistance heterotrophic bacteria and physico-chemical characteristics of Muthupettai mangrove environment, Southeast coast of India. *Environmental Science & Technology*. 4:139–149.

MARAVIC A, SKOČIBUŠIĆ M, FREDOTOVIĆ Z, ŠAMANIĆ I, CVJETAN S, KNEZOVIĆ M, PUIZINA J. 2016. Urban riverine environment is a source of multidrug-resistant and ESBL-producing clinically important *Acinetobacter* sp. *Environmental Science and Pollution Research*. 23:3525–3535.

MARTI E, VARIATZA E, BALCAZAR JL. 2014. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*. 22(1):36:41.

MARTINEZ JL. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*. 157:2893–2902.

MARTINS VV, ZANETTI MOB, SILVA AP, STEHLING EG. 2014. Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. *Environmental Science and Pollution Research*. 21:5873–5878.

McMURRY LM, CULLINANE JC, PETRUCCI RE, LEVY SB. 1981. Active Uptake of Tetracycline by Membrane Vesicles from Susceptible *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 20(3):307-313.

MEIRELLES-PEREIRA F, PEREIRA MAS, SILVA MCG, GONÇALVES VD, BRUM PR, EAR CASTRO EAR, PEREIRA AA, ESTEVES FA, PEREIRA JAA. 2002. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of Importance to human infections. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33:287-293

MOORE ERB, TINDALL BJ, SANTOS VAP, PIEPER DH, RAMOS JL, PALLERONI NJ. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. *Prokaryotes* 6:646–703.

MOORE JE, RAO JR, MOORE PJA, MILLAR BC, GOLDSMITH CE, LOUGHREY A, ROONEY PJ. 2010. Determination of total antibiotic resistance in waterborne bacteria in rivers and streams in Northern Ireland: Can antibiotic-resistant bacteria be an indicator of ecological change? *Aquatic Ecology*. 44:349–358.

MORAES LP. Qualidade da água no sistema estuarino Tramandaí-Armazém, Rio Grande do Sul, Brasil, e percepção ambiental da comunidade local. Monografia de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas). 114f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MULET M, GOMILA M, SCOTTA C, SÁNCHEZ D, LALUCAT J, VALDÉS EG. 2012. Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequences analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*. 35:455-464.

MUZIASARI WI, K Parnanen, Johnson TA, Lyra C, Karkman A, Stedtfeld RD, Tamminen M, Tiedje JM, Virta M. 2016. Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. 92:1-7.

NASCIMENTO ED, ARAUJO MFF. 2014. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review. *Revista Ambiente & Água*. 9(2):239-241.

NASHNOUSH H, ELSHAREF MM, RAMADAN AAB, ALBAKOUSH M, GHENGHESH KS. 2009. Bacteriological quality of drinking water From water vendors in Tripoli-Libya. *The Libyan Journal of Infectious Diseases*. 3(2):7-12.

NASREEN M, SARKER A, MALEK MA, ANSARUZZAMAN M, RAHMAN, M. 2015. Prevalence and resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surface water. *Advances in Microbiology*. 5:74-81.

NELSON ML, LEVY SB. 2011. The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1241:17–32

NEMEC A, MUSÍLEK M, MAIXNEROVÁ M. 2009. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59:118–124.

NEONAKIS IK, SPANDIDOS DA, EFTHIMIA P. 2011. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37 102–109.

NIKOKAR I, TISHAYAR A, FLAKIYAN Z, ALIJANI K, REHANA-BANISAEED S, HOSSINPOUR M, AMIR-ALVAEI S, ARAGHIAN A. 2013. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 5(1):36-41.

NOVO A, ANDRÉ S, VIANA P, NUNES OC, MANAIA CM. 2013. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Research*. 47:1875-1887.

OH JY, JEONG YW, JOO HS, CHONG WS, LEE JC, TAMANG MD, LEE WB, PARK JC. 2009. Distribution of genomic species and antimicrobial susceptibility in *Acinetobacters* isolated from Gangjin Bay, Korea. *Journal of Bacteriology and Virology*. 39:247-256.

OLGA P, APOSTOLOS V, ALEXIS G, GEORGE V, ATHENA M. 2016. Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various Greek aquatic environments. *Federation of European Microbiological Societies*. 92: 1-8.

OLIVEIRA JHL, GRANATO AC, HIRATA DB, HOKKA CO, BARBOZA M. 2009. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. *Quimica Nova*. 32(8):2142-2150.

OLMOS AF, CASTILLO MG, MOROSINI MA, LAMAS A, MÁIZ L, CANTÓN R. 2012. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram- negative isolates from cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. 11:59–62.

OU D, CHEN B, BAI R, SONG P, LIN H. 2015. Contamination of sulfonamide antibiotics and sulfamethazine-resistant bacteria in the downstream and estuarine

areas of Jiulong River in Southeast China. *Environmental Science and Pollution Research*. 22:12104–12113.

PALLERONI NJ, PIEPER DH, MOORE ERB. 2010. Microbiology of Hydrocarbon-Degrading *Pseudomonas*. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. 1787-1798.

PALLERONI NJ. 1984. Genus I. *Pseudomonas*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1:141–199. Edited by Krieg NR, Holt JG. Baltimore: Williams & Wilkins.

PALLERONI NJ. 2010. The *Pseudomonas* Story. *Environmental Microbiology*. 12(6):1377–1383.

PALLERONI NJ, DOUDOROFF M. 1972. Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas*. *Annual Review Phytopathology*. 10:73-100.

PAULSE AN, JACKSON VA, KHAN S, KHAN W. 2012. Isolation and identification of bacterial pollutants from the Berg and Plankenburg Rivers in the Western Cape, South Africa. *Water SA*. 38(5):819-824.

PEIX A, BAHENA MHR, VELÁZQUEZ E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*. 9:1132–1147.

PELEG A, SEIFERT H, PATERSON DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 21(3):538–582.

PEREZ F, ENDIMIANI A, HUJER KM, BONOMO RA. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*. 7:459–469.

PFEIFER Y, CULLIK A, WITTE W. 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 300:371–379.

Plano da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí. Rio Grande do Sul: Ministério Público. Disponível em: <[http://www.mp.rs.gov.br/areas/paibh/arquivos/pano\\_bacia\\_hidrografica\\_rio\\_tramandaí.pdf](http://www.mp.rs.gov.br/areas/paibh/arquivos/pano_bacia_hidrografica_rio_tramandaí.pdf)> Acesso em 20 dez. 2016.

RELLA, M., AND D. HAAS. 1982. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO to nalidixic acid and low levels of beta-lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22:242–249.

RIZZO, L., MANAIA, C., MERLIN, C., SCHWARTZ, T., DAGOT, C., PLOY, M.C. ET AL. 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of The Total Environment*, 447, 345–360.

ROBERTS MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. 1996. *FEMS Microbiology Reviews.* 19(1):1-24.

ROCHA ND, VAZ-MOREIRA C, STADLER IS, MOORE LER, MANAIA CM. 2013. Diversity and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. in water from the source to the tap. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 97:329– 340.

ROCHA MP, DOURADO PLR, RODRIGUES MS, RAPOSO JLR, GRISOLIA AB, OLIVEIRA KMP. 2015. The influence of industrial and agricultural waste on water quality in the Água Boa stream (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil). *Environment Monitoring Assessment.* 187:442.

RODRIGUES-MOZAZ S, CHAMORRO S, MARTI E, HUERTA B, GROS M, MELSIÓ AS, BORREGO CM, BARCELÓ D, BALCÁZAR JL. 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research.* 69:234-242.

SALA-COMOMERA L, BLANCH AR, VILARÓ C, GALOFRÉ B, GARCÍA-ALJARO C. 2016. *Pseudomonas*-related populations associated with reverse osmosis in drinking water treatment. *Journal of Environmental Management.* 182:335-341.

SÁNCHEZ D, MATTHIJS S, GOMILA M, TRICOT C, MULET M, VALDÉS EG, LALUCATA J. 2014. *rpoD* Gene Pyrosequencing for the Assessment of *Pseudomonas* Diversity in a Water Sample from the Woluwe River. *Applied and Environmental Microbiology.* 80(15):4738–4744.

SANDRIN TR, GOLDSTEIN JE, SCHUMAKER S. 2013. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrometry Reviews.* 32:188–217.

SAUVAGE E, KERFF F, TERRAK M, AYALA JA, CHARLIER PC. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan Biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 32:234–258.

SCHNEIDER R, NADVORNY A, SCHMIDT V. 2009. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* strains isolated from surface water and groundwater samples in a pig production area. *Biotemas*. 22(3):11–17.

SCHWARTZ T, ARMANT O, BRETSCHEIDER N, HAHN A, KIRCHNER S, SEIFERT M, DOTSCH A. 2014. Whole genome and transcriptome analyses of environmental antibiotic sensitive and multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates exposed to waste water and tap water. *Microbial Biotechnology*. 8:116-130.

SENGUPTA S, CHATTOPADHYAY MK, GROSSART HP. 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*. 4:47

SHAH PM, ISAACS RD. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. 2003. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52:538–542.

SHAH SQA, CABELLO FC, L'ABÉE-LUND L, TOMOVA A, GODFREY HP, BUSCHMANN AH, SORUM H. 2014. Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental Microbiology*. 16(5):1310-1320.

SHAKIBAIE MR, ADELI S, SALEHI MH. 2012. Antibiotic resistance patterns and extended- spectrum b-lactamase production among *Acinetobacter* sp. isolated from an intensive care Unit of a hospital in Kerman, Iran. *Antimicrobial resistance & Infection Control*. 1(1):1-8.

SHETE AM, MUJUMDAR SS, PAWAR SB, CHOPADE BA. 2015. Isolation, Biotyping, Biochemical and Physiological Characterization of Marine *Acinetobacter* Isolated from West Coast of India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2:277-301

SILVA CS, LAYBAUER L, DILLENBURG, SR. 2001. Incremento de nutrientes e metais pesados no registro sedimentar da Laguna de Tramandaí, litoral norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. In: Congresso da Abequa, 8., Imbé. Boletim de resumos. Porto Alegre: Abequa, p.451-452.

SILVA JMB, HOLLENBACH CB. 2010. Fluoroquinolonas x resistência bacteriana na medicina veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico*. 77(2):363-369.

SPINDLER A, OTTON LM, FUENTEFRIA DB, CORÇÃO G. Beta-lactams resistance and presence of class 1 integron in *Pseudomonas* spp. isolated from untreated hospital effluents in Brazil. 2012. *Antonie van Leeuwenhoek*. 102:73–81.

STANIER RY, PALLERONI NJ, DOUDOROFF M. 1966. The Aerobic Pseudomonads: a Taxonomic Study. *Journal of general Microbiology*. 43:159-271.

STEFFEE CH. 1992. Alexander Fleming and penicillin: The chance of a lifetime? *North Carolina Medical Journal*. 53:308–10.

STENSTROM TA, OKOH AI, ADEGOKE AA. 2016. Antibiogram of environmental isolates of *Acinetobacter calcoaceticus* from nkonkobe municipality, south Africa. *Fresenius Environmental Bulletin*. 25(8):3059-3065.

STURENBURG E, MACK D. 2003. Extended-spectrum b-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection*. 47:273–295.

SUZUKI Y, KAJII S, NISHIYAMA M, IGUCHI A. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agentes. 2013. *Science of the Total Environment*. 450(451):148–154.

TACÃO M, CORREIA A, HENRIQUES I. 2012. Resistance to Broad-Spectrum Antibiotics in Aquatic Systems: Anthropogenic Activities Modulate the Dissemination of *bla*CTX-M-Like Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(12):4134–4140.

TACÃO M, MOURA A, CORREIA A, HENRIQUES I. 2014. Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems. *Water Research*. 48:100-107.

TAMAMES J, ABELLAN JJ, PIGNATELLI M, CAMACHO A, MOYA A. 2010. Environmental distribution of prokaryotic taxa. *BMC Microbiology*. 10:85-99.

TEIXEIRA AB. 2013. Avaliação de método de identificação molecular e distribuição das espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* em dois hospitais de Porto Alegre. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre.



TENOVER FC. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine. 119(6):3–10.

THIELE-BRUHN S. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soil – a review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 166:145-167.

TILLOTSON GS. 1996. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. Journal of Medical Microbiology. 44:320-324.

TOH BEW, PATERSON DL, KAMOLVIT W, ZOWAWI H, KVASKOFF D, SIDJABAT H, WAILAN A, PELEG AY, HUBER CA. 2015. Species identification within *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* complex using MALDI-TOF MS. Journal of Microbiological Methods. 118:128–132.

TOUATI A, BRASME L, BENALLAOUA, GHAROUT A, MADOUX J, CHAMPS CD. 2008. First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 60:287–290.

TOUCH M, CURY J, YOON E, KRIZOVA L, CERQUEIRA GC, MURPHY C, FELDGARDEN M, WORTMAN J, CLERMONT D, LAMBERT T. 2014. The Genomic Diversification of the Whole *Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences. Genome Biology and Evolution. 6(10):2866–2882.

TOWNER KJ. 1997. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* sp. Journal of Medical Microbiology - Microbiology Society Journals. 46:721-746.

TRIPATHI PC, GAJBHIYE SR, AGRAWAL GN. 2014. Clinical and antimicrobial profile of *Acinetobacter* sp.: An emerging nosocomial superbug. Advanced Biomedical Research. 3-13.

TURANO H, GOMES F, MEDEIROS M, OLIVEIRA S, FONTES LC, SATO MIZ, LINCOPAN N. 2016. Presence of high-risk clones of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 86:80–82.

ULLAH A, DURRANI R, ALI G, AHMED S. 2012. Prevalence of antimicrobial resistant *Pseudomonas aeruginosa* in fresh water spring contaminated with domestic sewage. Journal of Biological and Food Science Research. 1(2):19-22.

VAN LOOVEREN M, GOOSSENS H. 2004. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 10:684-704.

VAZ-MOREIRA I, NUNES OC, MANAIA CM. 2012. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Science of the Total Environment*. 426:366-374.

VAZ-MOREIRA I, NUNES OC, MANAIA CM. 2014. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiology Reviews*. 38:761–18.

VITTECOQ M, GODREUIL S, PRUGNOLLE F, DURAND P, BRAZIER L, RENAUD N, ARNAL A, ABERKANE S, PIERRE HJ, CLERC MG, THOMAS F, RENAUD F. 2016. Antimicrobial resistance in wildlife. *Journal of Applied Ecology*. 53:519-529.

XIN F, CAI D, SUN Y, GUO D, WU Z, JIANG D. 2014. Exploring the diversity of *Acinetobacter* populations in river water with genus-specific primers and probes. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 60:51–58.

XIONG W, SUN Y, ZHANG T, DING X, LI Y, WANG M, ZENG Z. 2015. Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Community Composition in Fresh Water Aquaculture Environment in China. *Microbial Ecology*. 70:425–432.

XU J, XU Y, WANG H, GUO C, QIU H, HE Y, ZHANG Y, LI X, MENG X. 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*. 119:1379–1385.

ZARRILLI R, POURNARAS S, GIANNOULI M, TSAKRIS A. 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 41:11– 19.

ZHANG Y, MARRS CF, SIMON C, XI C. 2009. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Science of the Total Environment*. 407:3702–3706

ZHANG T, ZHANG XX, YE L. 2011. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PLOS ONE*. 6(10):1-7.

YAMAMOTO S, KASAI H, ARNOLD DL, JACKSON RW, VIVIAN A, HARAYAMA S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*. 146:2385-2394.

WELLINGTON EMH, BOXALL, ABA, CROSS P, FEIL E, GAZE WH, HAWKEY PM, ROLLINGS ASJ, JONES DL, LEE NM, OTTEN W, THOMAS CM, WILLIAMS AP. 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*. 13: 155–65.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>> Acesso em 19 jun. 2015.

WRIGHT GD. 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology*. 13:589–594.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Meios de Cultura

#### **Ágar Conservação**

Extrato de levedura – 3g

Peptona – 10g

NaCl – 8g

Fosfato de sódio bibásico – 2g

Ágar – 15g

#### **Ágar MacConkey**

Digestão pancreática de gelatina – 17g

Peptona – 3g

Lactose – 10g

Sais biliares – 1,5g

Cloreto de sódio – 5g

Vermelho Neutro:0,03g

Cristal violeta – 0,001g

Ágar – 15g

#### **Ágar Marinho**

Peptona de carne – 5g

Extrato de levedura – 1g

Citrato de ferro – 0,1g

Cloreto de sódio – 19,45g

Sulfato de sódio – 3,24g

Bicarbonato de sódio – 0,16g

Silicato de sódio – 0,004g

Fluoreto de sódio – 0,0024g

Fosfato dissódico – 0,008g

Cloreto de cálcio – 1,8g

Cloreto de magnésio – 8,8g

Cloreto de potássio – 0,55g

Brometo de potássio – 0,08g  
Cloreto de estrôncio – 0,03g  
Nitrato de amônio – 0,0016g  
Ácido bórico – 0,02g  
Ágar – 15g

### **Ágar Muller Hinton**

Extrato de carne – 2g  
Ácidos casamino – 17,5g  
Amido – 1,5g  
Ágar – 17g

### **Ágar PCA**

Triptona – 5g  
Extrato de levedura – 2,5g  
Glicose – 1g  
Ágar – 9g

### **Ágar TSA**

Hidrolisado enzimático de caseína – 15g  
Peptona de soja – 5g  
Cloreto de sódio – 5g  
Ágar – 15g

### **Ágar TSI**

Peptona especial – 20g  
Lactose – 10g  
Sacarose – 10g  
Glicose – 10g  
Sulfato férrico – 0,2g  
Tiosulfato de sódio – 0,3g  
Vermelho fenol – 0,025g  
Ágar – 12g

### **Caldo Nutriente**

Extrato de bife – 1g

Extrato de levedura – 2g

Peptona – 5g

Cloreto de Sódio – 5g

## **8.2 Soluções**

### **Hidróxido de potássio**

Hidróxido de potássio – 3g

Água destilada – 100 mL

### **Catalase**

Peróxido de hidrogênio – 3g

Água – 100mL