



ARTIGO

Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em micro-organismos isolados do Rio dos Sinos, RS, Brasil

Ana Bárbara Barth Hahn¹, Mariana Bahlis², Ana Paula Basso¹ e Sueli Teresinha Van Der Sand^{3*}

Recebido: 29 de dezembro de 2014 Recebido após revisão: 3 de maio de 2015 Aceito: 26 de agosto de 2015

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3264>

RESUMO: (Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em micro-organismos isolados do Rio dos Sinos, RS, Brasil). A bacia do Rio dos Sinos banha total ou parcialmente 32 municípios e integra uma área territorial de 3.600 km². Ao longo do seu curso, recebe vários tipos de dejetos oriundos de esgoto pluvial, doméstico e industrial. Sendo assim, o rio recebe uma população microbiana bastante diversificada, possibilitando a presença de micro-organismos com fenótipo de resistência a diferentes antimicrobianos e a metais pesados. O objetivo principal desse estudo foi avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados de bactérias isoladas no Rio dos Sinos. Foram testados 410 micro-organismos isolados da água bruta de estações de tratamento que recebem as águas oriundas do Rio dos Sinos nos municípios de Três Coroas, Novo Hamburgo e Esteio, nas quatro estações do ano. O ensaio de susceptibilidade foi realizado com 13 antimicrobianos. Todos os isolados foram submetidos aos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) de metais pesados, os metais utilizados foram cromo, cobre e níquel. Foram também realizados testes de colimetria e contagem total de heterotróficos. Os resultados apontaram para um perfil de 77,32% dos isolados resistentes a ao menos um antimicrobiano e 49,03% foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos. O antimicrobiano com maior índice de resistência foi vancomicina, pois 64,15% de todos os isolados apresentaram resistência e o mais eficiente foi o imipenem, com cinco isolados resistentes. Quanto aos ensaios com metais pesados, 44,39% dos isolados foram resistentes com um CIM superior a 802,27 mg/L de níquel, 40,97% foram resistentes com um CIM superior a 509,24 mg/L para cobre e 12,92% dos micro-organismos foram resistentes com CIM superior a 707,04 mg/L de cromo. Levando em consideração os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos, coliformes totais e termotolerantes, as águas do Rio dos Sinos, até o ponto próximo da nascente, seriam classificadas como classe 3 pelas normas do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.

Palavras Chave: Qualidade da água bruta, Rio dos Sinos, resistência a antimicrobianos, resistência a metais pesados.

ABSTRACT: (Evaluation of the antimicrobial and heavy metal resistance profile of microorganisms isolated from Sinos River, Rio Grande do Sul state, Brazil). The Sinos River basin covers, either entirely or partially, 32 municipalities, and encompasses a land area of 3,600 km². Along its extension, it receives several types of wastes from pluvial, domestic and industrial sewage. Hence, the river receives quite diverse microbial populations, which eventually include microorganisms with resistance phenotypes to different antibiotics and heavy metals. We aimed to evaluate the antimicrobial and heavy metal resistance profile of bacteria isolated from Sinos River. For that, we tested 410 microorganisms isolated from crude water of sewage treatment plants that receive water from the river, in the municipalities of Três Coroas, Esteio and Novo Hamburgo. Collections were performed along the four seasons of the year. The susceptibility assay was performed using 13 antimicrobials. All isolated microorganisms were subjected to the minimum inhibitory concentration (MIC) assay with heavy metals chromium, copper and nickel. Also, coliform and total heterotrophic counts were made. Our results showed a profile of 77.32% isolates resistant to at least one antimicrobial and 49.03% resistant to two or more antimicrobials. The antimicrobial with the highest resistance rate was vancomycin (64.15%), and the most efficient one was imipenem, with five resistant isolates. Regarding the heavy metal assays, 44.39% bacteria were resistant to nickel, with a MIC higher than 802.27 mg/L; 40.97% were resistant to copper, with a MIC higher than 509.24 mg/L; and 12.92% were resistant to chromium, with a MIC higher than 707.04 mg/L. Considering our results on physicochemical parameters and total and thermotolerant coliform counts, the waters of Sinos River, up near its source, should be categorized in class 3 according to the CONAMA (Brazilian National Environmental Council) standards.

Keywords: crude water quality, Sinos River, antimicrobial resistance, heavy metal resistance.

INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural indispensável à sobrevivência do homem e demais seres vivos do Planeta (ANA 2012, Paz *et al.* 2000). A água para consumo humano é um dos importantes veículos de enfermidades diarreicas de natureza infecciosa, o que torna primordial a avaliação da qualidade microbiológica da mesma (Merten & Minella 2002, Isaac-Marquez *et al.* 2004, Libânio *et al.* 2005).

A bacia do Rio dos Sinos localizada no Rio Grande do Sul tem suas nascentes localizadas na região meridional da Serra Geral, abrange total ou parcialmente 32 municípios e integra uma área territorial de 3.600 km². No seu curso superior, o rio apresenta boa qualidade de água, e no curso inferior a sua qualidade é comprometida pela entrada de poluentes oriundos de uma grande área densamente habitada, onde resíduos domésticos e industriais são lançados na rede hídrica sem um tratamento adequado

1. Mestre do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Estudante de graduação do curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

3. PhD, Professor Titular, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: svands@ufrgs.br

(FEPAM 2013). Ao longo dos anos inúmeras empresas, de porte muito variado, foram se instalando em suas margens. Hoje, este núcleo de empresas constitui uma das principais aglomerações industriais do Vale do Rio dos Sinos (Parecer MP/RS 2008, COMITESINOS 2009).

O esgoto é caracterizado por conter despejos provenientes do uso doméstico, comercial, agrícola e industrial. As diferentes características biológicas, físicas e químicas destes ambientes propiciam a formação de nichos diversificados habitados por micro-organismos distintos (Jordão *et al.* 1999).

A resistência da população microbiana aos antimicrobianos é um problema e uma preocupação mundial atualmente. Esta pode ser natural (intrínseca) ou adquirida e pode ser transmitida horizontal ou verticalmente (Oliveira & Silva 2008, Kümmerer 2009). O uso sem controle dos antimicrobianos e a despreocupação com o descarte dos resíduos dessas substâncias favorecem a seleção de cepas multirresistentes (Alanis 2005).

Da mesma forma, os metais pesados amplamente utilizados na indústria, muitas vezes chegam ao ambiente através de efluentes industriais sem um tratamento adequado para a remoção desses compostos, gerando alto grau de poluição e impacto ambiental, sendo transportados via cadeia alimentar para diversos níveis tróficos (Passianoto *et al.* 2001, Jimenez *et al.* 2004, Naime & Nascimento 2009a). A presença constante de metais pesados presentes no ambiente como poluentes faz com que micro-organismos desenvolvam mecanismos de resistência a esses compostos. Como as vias de resistência a metais e antimicrobianos muitas vezes são iguais ou semelhantes, os micro-organismos podem desenvolver resistência a um ou outro ou ambos e, normalmente, essa resistência está associada a plasmídeos (Chattopadhyay & Grossart 2011).

Sendo a bacia do Rio dos Sinos de grande importância para o estado, os objetivos deste trabalho foram avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados de bactérias isoladas de três pontos de coleta, em três estações de tratamento, ao longo do Rio dos Sinos e também avaliar a qualidade da água em relação aos coliformes e bactérias heterotróficas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Locais de amostragem

As coletas das amostras foram realizadas nos municípios de: Três Coroas (localizado na latitude de 29°31'01" sul e a uma longitude 50°46'40" oeste), o ponto mais próximo da nascente; Novo Hamburgo (latitude 29°40'42" sul e longitude oeste 51°07'50"), um dos municípios mais populosos com 100% da sua população na bacia, e Esteio (localizado na latitude 29°50'10" sul e 51°09'15" longitude oeste), ponto mais perto da foz. As amostras foram coletadas nas estações de tratamento de água dos respectivos municípios, diretamente das tubulações de água bruta captada do Rio dos Sinos. Frascos estéreis de 500 mL foram utilizados para armazenar 400

mL de água e estes foram mantidos sob refrigeração até o momento de processamento. Foram realizadas quatro coletas sazonais (uma por estação do ano), sendo a primeira realizada no inverno (setembro de 2011), seguida da coleta na primavera (dezembro de 2011), verão (março de 2012) e a última realizada no outono (abril de 2012).

Isolamento bacteriano

As amostras de água bruta passaram por diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} e 100 μ L de cada diluição foi semeada em placas de Petri contendo: ágar triptona de soja (TSA), ágar R-2A, ágar padrão para contagem (PCA), ágar eosina azul de metileno (EMB) e ágar cetrímide. As placas foram incubadas a 30 °C por 24-48h. O ensaio foi realizado em triplicata. A seleção das unidades formadoras de colônia (UFC) foi baseada no método dos quadrantes conforme Oliveira *et al.* (2006). As colônias foram submetidas à coloração de Gram, para confirmação da pureza e classificação. Os isolados foram crescidos em caldo triptona de soja (TSB) a 37 °C por 18h e armazenados em glicerol 20%, na temperatura de -20 °C. As colônias das bactérias heterotróficas, crescidas nas placas com meio PCA, foram contadas e foram consideradas aquelas diluições que apresentavam entre 30 e 300 colônias por placa.

Ensaio de colimetria- Teste dos tubos múltiplos

O teste colimétrico foi realizado pela técnica de fermentação em tubos múltiplos, com seriação de cinco tubos para a determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes – com padronização para *Escherichia coli* (BRASIL 2006). Para realização deste teste foi utilizada a amostra na diluição de 10^{-2} para o município de Três Coroas e 10^{-3} para os municípios de Novo Hamburgo e Esteio.

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas das amostras foram realizadas em um laboratório particular onde foram determinadas a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), a Demanda Química de Oxigênio (DQO) e a concentração dos metais cromo, cobre e chumbo presentes nas amostras. As análises-físico-químicas foram realizadas na primeira e última coleta.

Ensaio de resistência a antimicrobianos

Os antibiogramas foram realizados seguindo as normas do *Clinical and Laboratory Standart Institute* (CLSI 2009) utilizando o método de difusão em disco-Kirby-Bauer (Bauer *et al.* 1966). Foram utilizados 13 antimicrobianos de 8 classes: cefalosporinas: cefalotina (CFL 30 μ g), cefoxitina (CFO 30 μ g) e ceftriaxona (CRO 30 μ g); glicopeptídeo: vancomicina (VAN 30 μ g); aminoglicosídeos: estreptomicina (EST 10 μ g) e gentamicina (GEN 10 μ g); sulfazotrim (SUT 25 μ g), fluorquinolonas: ciprofloxacina (CIP 5 μ g) e norfloxacina (NOR 10 μ g); carbapenêmicos: imipenem (IMP 10 μ g);

tetraciclina (TET 30 µg); cloranfenicol (CLO 30 µg); nitrofurantóina (NIT 300 µg). As placas foram incubadas a 37 °C por 18 - 24h e após esse período os halos de inibição foram medidos. A interpretação das zonas de inibição foi realizada de acordo com a tabela de valores de resistência e antibiogramas da CLSI (2009).

Testes de concentração inibitória mínima para metais pesados

Os testes de Concentração Inibitória Mínima para metais pesados (CIM) foram conduzidos utilizando a técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços, segundo Giovanella *et al.* (2011), com modificações. Em cada poço foi adicionado 97,5% de caldo TSB (195 µL) com diferentes concentrações de soluções dos sais metálicos e 2,5% da cultura microbiana (5 µL). Os sais metálicos utilizados foram dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), com concentrações de 0,5 a 3,5 g/L, sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) de 0,5 a 3,5g/L e dicloreto de níquel heptahidratado (NiCl₂.7H₂O) com concentrações salinas no intervalo de 0,5 a 3,5 g/L. Esses metais foram escolhidos pois já haviam sido encontrados no Rio dos Sinos em estudos prévios realizados pela Fundação Estadual de Proteção ao Meio Ambiente (FEPAM). Os experimentos foram conduzidos em triplicata, mais controle positivo de crescimento do inóculo; controle negativo de crescimento do inóculo e controle negativo do teste. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h e posteriormente uma alíquota de 20 µL de cada poço com concentrado salino e cultura, porém sem turbidez, foram inoculadas em placas de TSA e incubadas a 37 °C por 24h. A concentração salina da qual não se obteve crescimento em placa foi a concentração mínima biocida considerada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de água bruta oriundas do Rio dos Sinos foram coletadas nas quatro estações do ano e, em todas as coletas, os três pontos coletados foram submetidos a todas as análises, com exceção dos parâmetros físico-químicos,

que foram realizados na primeira e última coleta. No ensaio da colimetria observou-se um aumento do número de coliformes totais e termotolerantes à medida que os pontos se distanciavam da nascente do rio. A presença de coliformes termotolerantes está geralmente associada às doenças de veiculação hídrica (ANA 2012).

O município de Três Coroas possui em todas as coletas os menores valores para coliformes totais e termotolerantes (Tab. 1), enquadrando-se, segundo as diretrizes da resolução 430/2011 do CONAMA em águas de classe 2. Somente a coleta realizada no verão, no ponto Três Coroas, os valores de coliformes termotolerantes foram mais altos, 1,5x10⁴NMP/100 mL, o que enquadraria as suas águas na classe 3 na classificação do CONAMA. As amostras coletadas no município de Novo Hamburgo foram classificadas como classe 3, no entanto na coleta do verão a concentração de coliformes termotolerantes foi de 5x10⁴NMP/100mL,excedendo o limite para essa classe. As amostras do município de Esteio apresentaram em todas as coletas os maiores valores para coliformes totais e termotolerantes. Destacam-se as coletas de verão e outono com número mais provável de 5x10⁴NMP/100 mL, enquadrando a água do município na classe 4. Esse resultado caracteriza a grande poluição do local onde, provavelmente, estaria acontecendo despejo de esgoto doméstico e industrial sem o devido tratamento e ainda, considerando que este ponto é próximo da foz do rio, o nível da carga de poluição é maior uma vez que esta vem acontecendo ao longo de toda a bacia.

Na primeira coleta, realizada no inverno, foram observados valores mais baixos de coliformes (Tab. 1). Moura *et al.* (2009) e Pinto (2010) também observaram índices colimétricos menores no inverno, provavelmente devido às temperaturas mais baixas.

Victorette & Brentano (2010) e Naime & Nascimento (2009b) avaliaram o número de coliformes totais e termotolerantes constatando um aumento no número de micro-organismos no verão, corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho. Na segunda coleta (primavera), nos pontos de Novo Hamburgo e Esteio as diluições realizadas das amostras não foram

Tabela 1. Número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes por 100 mL de amostras de água dos diferentes pontos de coleta no Rio dos Sinos e contagem de bactérias heterotróficas.

Coleta*	Pontos	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	Contagem de heterotróficas
1	Três Coroas	1,1x10 ⁴	7x10 ³	3,08x10 ⁴
1	Novo Hamburgo	3x10 ⁴	1,3x10 ⁴	3,88x10 ⁴
1	Esteio	4,9x10 ⁴	3x10 ⁴	6,83x10 ⁴
2	Três Coroas	4,3x10 ⁴	1,5x10 ³	3,83x10 ⁴
2	Novo Hamburgo	≥1,1x10 ⁴	7,5x10 ⁴	1,21x10 ⁵
2	Esteio	≥1,1x10 ⁴	≥1,1x10 ⁴	1,45x10 ⁵
3	Três Coroas	1,75x10 ⁴	1,5x10 ⁴	1,9x10 ⁵
3	Novo Hamburgo	9x10 ⁴	5x10 ⁴	3x10 ⁵
3	Esteio	9x10 ⁴	5x10 ⁴	4,7x10 ⁵
4	Três Coroas	1,7x10 ⁴	7x10 ³	2,2x10 ⁴
4	Novo Hamburgo	4,9x10 ⁴	1,1x10 ⁴	1,01x10 ⁵
4	Esteio	1,1x10 ⁵	5x10 ⁴	1,31x10 ⁵

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

suficientes, pois os valores extrapolaram para a determinação do número mais provável de coliformes e, por consequência, não foi possível determinar o que seria efetivamente o NMP dessa coleta nestes pontos (Tab. 1). Conforme esperado, houve um aumento no número de coliformes totais e termotolerantes ao longo do curso do rio. Nas cidades de Novo Hamburgo e Esteio, o grau de impacto ambiental é maior e o rio recebe uma maior quantidade de efluentes domésticos e industriais, como consequência esses valores são maiores. Segundo Naime & Nascimento (2009b) para o parâmetro de *Escherichia coli*, as águas do arroio Pampa (importante afluente do rio dos Sinos) apresentaram resultados semelhantes ao esgoto local, indicando que a ação antrópica é um dos fatores fundamentais na influência sobre a qualidade de água do arroio que monitoram.

Na contagem de bactérias heterotróficas, o município de Três Coroas sempre apresentou os menores valores para bactérias heterotróficas, quando comparado a Novo Hamburgo e Esteio (Tab. 1). A contagem de bactérias heterotróficas acompanhou ao longo do curso das coletas os resultados de coliformes totais e termotolerantes. A coleta realizada no verão apresentou as maiores contagens em todos os pontos. Oliveira *et al.* (2012), ao avaliarem esse parâmetro no Arroio Dilúvio em Porto Alegre/RS, observaram padrão similar para as contagens de bactérias heterotróficas, assim como o número de coliformes totais e termotolerantes.

Os parâmetros físico-químicos foram avaliados na primeira e na última coleta (Tab. 2). Os valores referentes à concentração dos metais pesados não foram possíveis de serem determinados na primeira coleta (inverno), pois devido aos grandes volumes de chuva os metais encontravam-se bastante diluídos e a técnica utilizada não foi suficientemente sensível para determinar a concentração dos mesmos. Na coleta realizada no outono, a concentração de cromo encontrava-se dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA/430 de 2011 que permitem até 0,5 mg/L de cromo total. Segundo Naime & Fagundes (2005), a pluviosidade auxilia na diluição deste metal pesado. Porém, foi possível observar que a concentração do metal é crescente ao longo do curso do rio (Tab. 2). Oliveira *et al.* (2012), ao avaliarem a concentração de cromo hexavalente nas águas do Rio dos Sinos no município de Novo Hamburgo, observaram valores

dentro do limite permitido na coleta que foi realizada no verão e superiores ao permitido na coleta realizada no outono. Para Naime & Fagundes (2005), os valores de cromo indicam a influência dos curtumes, da vizinha cidade de Estância Velha, na qualidade da água do Arroio Portão/Novo Hamburgo por eles estudado. Os valores do metal chumbo e níquel encontraram-se dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA/430 (2011), com valores máximos permitidos de 0,03 mg/L e 0,025 mg/L respectivamente. Naime & Nascimento (2009c) relatam que o chumbo foi o metal encontrado em apenas uma das nove coletas entre maio de 2006 e 2007, no Arroio Pampa. Oliveira *et al.* (2012) relataram que, no arroio Dilúvio em Porto Alegre/RS, a concentração de chumbo também encontrava-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente. No município de Três Coroas, nas duas análises realizadas, o metal não foi encontrado, indicando que este metal é de origem antrópica. O valor mais alto encontrado foi no ponto do município de Novo Hamburgo, mas ainda assim dentro dos padrões estabelecidos. O ponto no município de Esteio apresentou índices aceitáveis pela legislação do CONAMA/430 (2011), da mesma forma no relatório divulgado pela FEPAM (2009) para o município de Esteio.

Para demanda bioquímica de oxigênio (DBO), os resultados foram similares na análise das duas coletas realizadas. Os resultados para o parâmetro DBO (segundo a resolução do CONAMA n°20/86) na amostra de água de Três Coroas, na primeira coleta seria de qualidade boa, sendo classificada como classe 2. Segundo relatório da FEPAM (2009), o trecho superior do Rio dos Sinos apresenta água de qualidade superior aos trechos médio e inferior, que estão expostos a um maior impacto ambiental. No entanto, o ponto de Esteio, na quarta coleta, apresentou o melhor valor para DBO, com concentrações de 2,5 mg O₂/L enquadrando-se no padrão de classe 1. Tal resultado é bastante contraditório daquele esperado para as águas do município de Esteio. Strieder *et al.* (2006) observaram DBO de classe 1 no trecho inferior do Rio dos Sinos em Novo Hamburgo. Naime & Fagundes (2005) afirmam que os valores de concentração de matéria orgânica (DBO) são variáveis em função da vazão dos cursos d'água, assim o período de coleta pode influenciar nesse resultado. Ao analisarmos as tabelas 1 e 2, os resultados do presente trabalho apontam para uma

Tabela 2. Análises físico-químicas das águas do Rio dos Sinos referentes à primeira (inverno) e à quarta coleta (outono).

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

qualidade de água ruim, classe 3, de acordo com dos parâmetros do CONAMA 430/2011, quando considerados os parâmetros coliformes totais e termotolerantes e os valores de DQO. Segundo relatório da FEPAM (2009), ao entrar nas regiões metropolitanas as concentrações de matéria orgânica aumentam, resultando em água de pior qualidade.

Na coleta de outono, a DBO de Três Coroas foi de 5 mg O₂/L, este resultado pode ser devido à diminuição das chuvas no verão e no início do outono, o que aumentaria a concentração de matéria orgânica nas águas do município. Nas duas coletas realizadas em Novo Hamburgo e na primeira coleta realizada em Esteio, os valores de DBO foram similares (>5 mg O₂/L), com o padrão de qualidade da água de classe 2. Segundo Naime & Nascimento (2009b), o arroio Pampa em Novo Hamburgo apresentava, em toda a sua extensão, altos níveis de poluição doméstica, com valores comparáveis aos do esgoto doméstico bruto. Na avaliação do arroio Peão, também no município de Novo Hamburgo, os valores de DBO em dois pontos de coleta foram superiores a 7 mg O₂/L (Strieder *et al.* 2006).

O aumento da concentração de DQO num corpo d'água deve-se principalmente a despejos de origem industrial (Victorette & Brentano 2006). No presente trabalho observamos que os valores de DQO são crescentes conforme acontece um distanciamento da nascente. No Rio Grande do Sul os limites máximos estabelecidos para DQO, de acordo com a portaria número 05/89 da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente (SSMA) estão entre ≤ 450 mg O₂/L. Sendo assim, as águas do Rio dos Sinos encontram-se dentro dos valores estabelecidos pela Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente.

Perfil de resistência a antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado para as 410 bactérias isoladas dos três pontos nas quatro coletas. Destas, 59 bactérias foram isoladas da primeira coleta, 76 da segunda coleta, 141 isoladas da terceira coleta e 134 isoladas da quarta coleta. Os antimicrobianos foram selecionados por serem de uso rotineiro na clínica humana e animal e apresentarem um amplo espectro de ação. Das bactérias isoladas e submetidas à coloração de Gram 94,39% foram bactérias Gram negativas. De todas as bactérias testadas no antibiograma 77,32% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 49,03% foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos (Fig. 1). Pontes *et al.* (2009), ao avaliar água de lagos em Rio Doce, observaram que 71% das bactérias Gram negativas eram multirresistentes. Canal (2010), ao avaliar o perfil de resistência de *Escherichia coli* na Lagoa dos Patos/RS, observou que 54,5% dos isolados na região de Rio Grande/RS eram resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos e, portanto consideradas multirresistentes. No presente trabalho foi considerado multirresistente aquele micro-organismo resistente a duas ou mais classes de antimicrobianos, conforme Canal (2010).

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

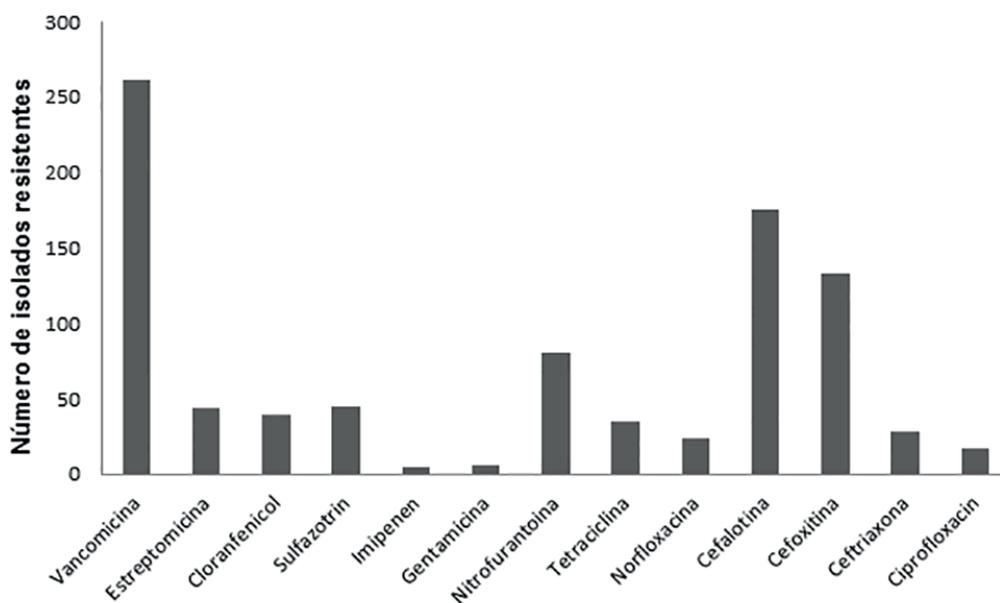


Figura 1. Número de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos utilizados nos ensaios de susceptibilidade.

Vancomicina foi o antimicrobiano ao qual as bactérias apresentaram maior perfil de resistência (64,15% das bactérias resistentes), seguido de cefalotina (42,93%) e cefoxitina (32,44%), respectivamente. As altas taxas de resistência à vancomicina devem-se provavelmente ao fato da grande maioria dos isolados serem Gram negativos. No entanto foi encontrado um isolado Gram positivo resistente a vancomicina na terceira coleta, no ponto de coleta de Novo Hamburgo. Vancomicina é um importante antimicrobiano no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram positivas. O perfil de resistência aos demais antimicrobianos foi mais baixo (Fig. 1). Koch *et al.* (2008), avaliando a resistência de uropatógenos, observaram que 46,7% dos isolados eram resistentes à cefalotina e 22,3% apresentaram resistência à nitrofurantoína. Índices similares foram observados nesse estudo, onde 19,27% dos micro-organismos avaliados apresentaram fenótipo de resistência a nitrofurantoína. O que cabe ressaltar é que os altos índices de resistência a antimicrobianos no presente trabalho foram observados em micro-organismos presentes em amostras de água e não em ambiente hospitalar.

Heck *et al.* (2011) reportaram, ao avaliar isolados de leira de compostagem, que 34,59% dos micro-organismos apresentaram resistência à cefoxitina. Dados similares foram obtidos nesse estudo, com 32,44% dos isolados resistentes a este antimicrobiano. No presente estudo, 91,46% dos isolados foram sensíveis à tetraciclina. Valores similares (88,4%) foram observados por Andrade *et al.* (2010) com isolados bacterianos do rio São Francisco. Uma alta taxa de isolados sensíveis à ceftriaxona (92,93%) também foi observada e resultados semelhantes foram relatados por Abreu *et al.* (2010) ana-

lisando micro-organismos isolados de efluente hospitalar em Maringá/PR.

Os antimicrobianos que foram mais eficientes na inibição do crescimento das bactérias foram o imipenem (cinco isolados resistentes), gentamicina (seis isolados resistentes) e ciprofloxacina (dezessete isolados resistentes). A resistência a imipenem está associada a genes de resistência móveis que podem, facilmente, ser transmitidos a outras bactérias presentes no ambiente onde estas se encontram. Resistência a imipenem, quando encontrada, é em ambiente hospitalar. Entretanto os microrganismos resistentes presentes em águas brutas, oriundas de um rio que corta diversas cidades, como é o caso do Rio dos Sinos, é um fator muito preocupante devido à possibilidade de disseminação dessa resistência para microrganismos potencialmente patogênicos presentes nestas águas. Heck *et al.* (2011) e Oliveira *et al.* (2012) obtiveram resultados semelhantes ao que se refere aos perfis de resistência aos antimicrobianos. Schneider *et al.* (2009), ao avaliarem o perfil de resistência a antimicrobianos em amostras isoladas em águas superficiais em área perto da produção de suínos, observaram 100% das bactérias sensíveis à gentamicina. Desta forma o conhecimento de drogas antimicrobianas as quais bactérias ainda apresentam sensibilidade é de fundamental importância, pois nos permite controlar o uso dessas drogas e, conseqüentemente, limitar a seleção de microrganismos resistentes.

Levando em consideração a sazonalidade, foi possível observar que a coleta do inverno apresentou os menores números de bactérias resistentes e a coleta do outono as maiores taxas de multirresistentes e também o maior número de isolados resistentes a cinco ou mais classes de antimicrobianos. Levando em consideração o número

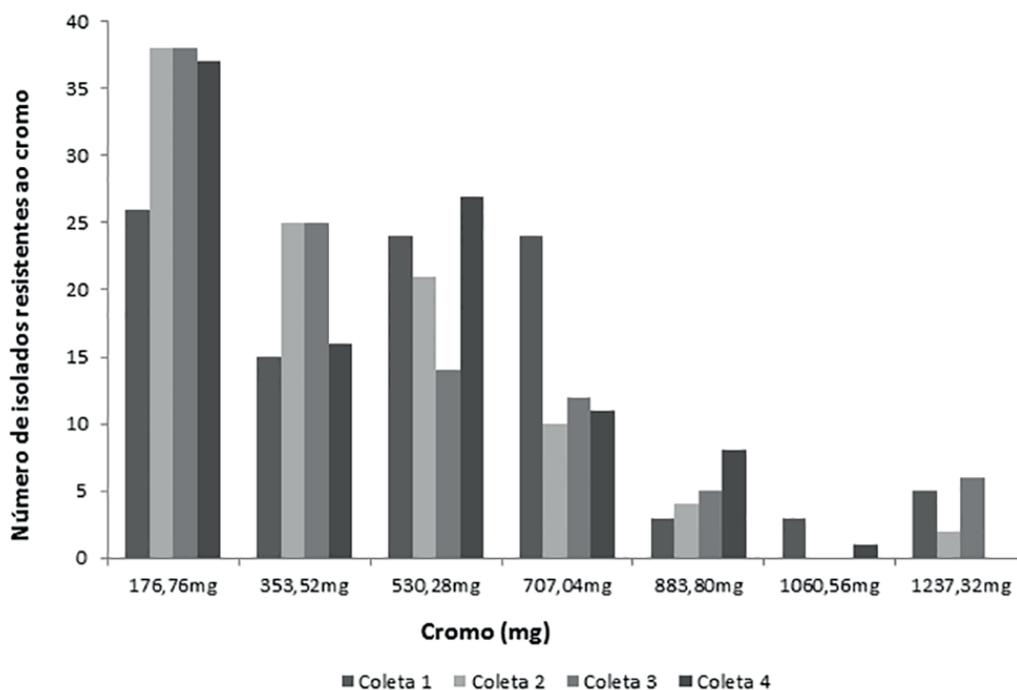


Figura 2. Perfil de resistência dos 410 isolados às diferentes concentrações do metal cromo nos 4 pontos de coleta.

de micro-organismos multirresistentes a mais de cinco classes de antimicrobianos, o ponto de Esteio foi o que apresentou maior número de isolados com esta característica, totalizando dezesseis isolados. Nas águas de Novo Hamburgo observamos onze isolados com essa característica e no ponto de Três Coroas sete bactérias apresentaram esse fenótipo. Portanto, quanto mais perto da foz do rio, mais poluição e maior o número de isolados resistentes a várias classes de antimicrobianos.

Concentração inibitória mínima (CIM) de metais pesados

Dentre as análises físico-químicas realizadas na primeira coleta e na quarta coleta, foi avaliada a presença de metais pesados nas águas dos municípios de Três Coroas, Novo Hamburgo e Esteio. Foram selecionados três metais – cromo, níquel e chumbo – para as análises, porém devido à decantação do metal chumbo na realização dos experimentos, o mesmo foi substituído pelo cobre nos ensaios. Os resultados obtidos, considerando todos os parâmetros e todos os pontos de coleta, indicaram que os valores encontrados nas amostras de água estão de acordo com os padrões determinados pela legislação nacional para qualidade das águas, resolução 430 de 2011 do CONAMA.

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

fotográfico entre outros (Basu *et al.* 1999).

Dos 410 isolados testados para o perfil de resistência aos metais pesados, foi possível observar que na primeira coleta e segunda coleta em torno de 25% e 38% dos isolados, respectivamente, mostraram-se resistentes à concentração de 176,76 mg/L de cromo. O número de isolados que apresentou resistência a concentrações maiores de cromo foi diminuindo a medida que as coletas foram se distanciando dos pontos de coleta mais poluídos (Fig. 2). Nenhum isolado da primeira coleta apresentou resistência à concentração de 883,80 mg/L. Os isolados da quarta coleta apresentaram um perfil de resistência semelhante ao das coletas 2 e 3 na menor concentração, porém nas concentrações mais altas testadas, cerca de 8% apresentou resistência a 883,80 mg/L e somente um isolado foi capaz de crescer em 1060,56 mg/L de cromo.

Matyar *et al* (2010), ao avaliarem isolados do Mar Mediterrâneo, observaram que 38.3% das *Aeromonas* e 31.9% das *Pseudomonas* testadas no estudo foram resistentes a concentrações >3,200 mg/L de cromo. Shakori & Muneer (2002), ao testarem bactérias isoladas de águas residuais de efluentes industriais no Paquistão, observaram 100% de resistência a concentrações de 280 até 400 mg/L de cromo hexavalente. Sundar *et al.* (2011) testaram 46 micro-organismos isolados na Bacia do Rio Palar/Índia e 40 desses foram resistentes a concentrações entre 100 até 500 mg/L de cromo trivalente; 5 resistentes a concentrações entre 500 e 1500 mg/L de cromo trivalente e um isolado com resistência superior a 1500 mg/L de cromo trivalente.

O cobre desempenha uma infinidade de funções em

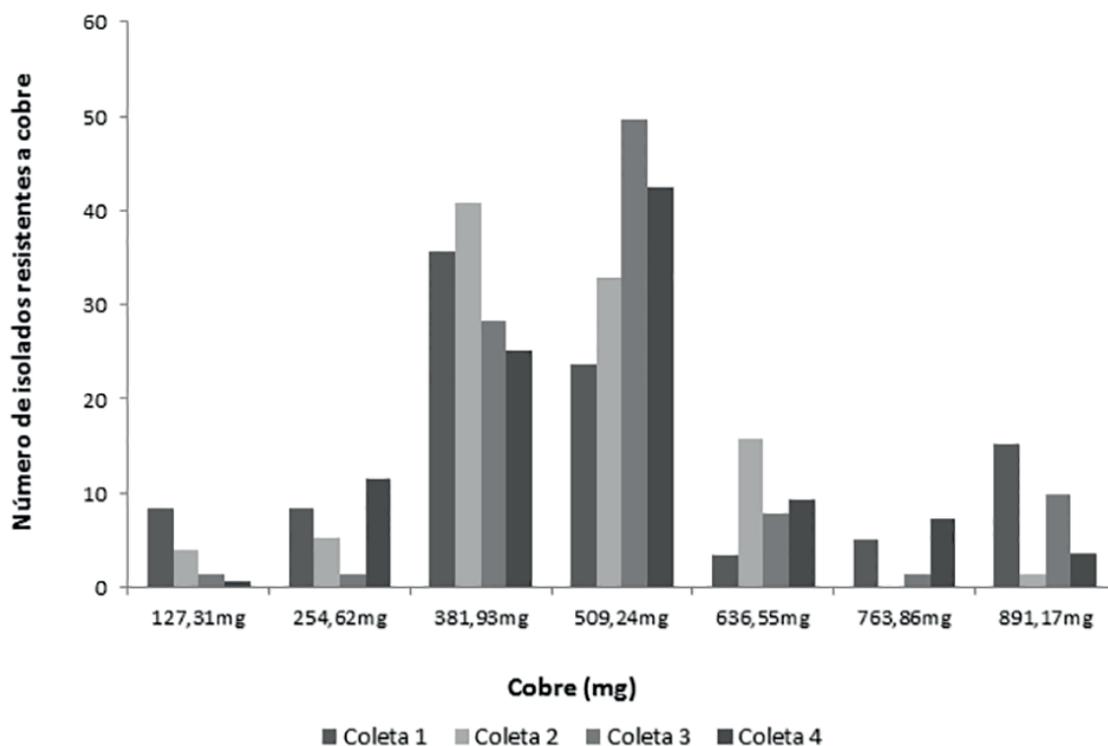


Figura 3. Perfil de resistência dos 410 isolados às diferentes concentrações do metal cobre nos quatro pontos de coleta.

sistemas biológicos, sendo um elemento essencial para a existência de todas as formas de vida conhecidas. Nos seres humanos, por exemplo, o cobre é o terceiro na abundância entre os metais pesados essenciais, depois de ferro e de zinco. Todos os organismos vivos necessitam de cobre, sendo um co-fator para os processos biológicos básicos, tais como a respiração (Colin *et al.* 2012). Os muitos usos do cobre na indústria têm difundido sua presença no ambiente, sendo encontrado em solos, lodo, nascentes e águas residuais. O metal tende a se acumular no solo, plantas e animais, aumentando suas concentrações nos níveis mais altos das cadeias alimentares (Georgopoulos *et al.* 2001).

Com os resultados obtidos no presente trabalho (Fig. 3), é possível observar que na primeira e segunda coleta menos de 10% dos isolados foram resistentes às concentrações de 127,31 mg/L e 254,62 mg/L de cobre. No entanto, 15% dos isolados foi resistente à concentração 891,17 mg/L na primeira coleta, e na segunda coleta nenhum micro-organismo foi resistente a 763,86 mg/L de cobre. Na terceira coleta, aproximadamente 50% dos isolados testados foram resistentes à concentração de 509,24 mg/L ao metal e na última mais de 40% dos micro-organismos foram resistentes à concentração de 509,24 mg/L de cobre; apenas 4% foram resistentes à concentração de 891,17 mg/L. Segundo Karbasizaed *et al.* (2003), 60% das *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de infecções nosocomiais em um hospital na localidade de Isfahan/Iran foram resistentes à concentração de 1750 mg/L de cobre. Miranda & Castilho (1998) observaram padrão intermediário de resistência

(entre 100 e 1000 mg/L) das *Aeromonas* isoladas de água doce do Chile. Shakoori & Muneer (2002), ao avaliarem micro-organismos isolados de curtumes no Paquistão, observaram que 67% dos isolados toleraram concentrações de cobre superiores a 400 mg/L.

Matyar *et al.* (2010) observaram que 54,3% dos isolados de *P. aeruginosa* isoladas de biofilmes foram resistentes à CIM entre 800 a 3200 mg/L de cobre. As concentrações de níquel variam muito em diferentes nichos ambientais. O metal níquel é um poluente industrial comum encontrado em águas residuais em torno de parques industriais. Este metal é tipicamente encontrado na água nas formas Ni(0) ou Ni(II) devido a sua estabilidade na água. A toxicidade do metal níquel para os seres humanos tem recebido atenção, pois está sendo associado ao aparecimento de câncer (Macomber *et al.* 2011).

É possível observar (Fig. 4) que na primeira e segunda coleta os micro-organismos foram menos resistentes às concentrações mais baixas de níquel, onde 5% dos isolados foram resistentes a concentrações de 114,61 mg/L e 229,22 mg/L, no entanto, 22% e 24% dos isolados, respectivamente foram resistentes à concentração de 802,27 mg/L. Alam *et al.* (2010), ao testarem bactérias isoladas de efluentes de um curtume em Kanpur/Índia, observaram que 52,5% foram resistentes à concentração de 200 mg/L, 1,6% à concentração de 800 mg/L e 1,0% resistentes à concentração de 1600 mg/L de Ni⁺². Castro-Silva *et al.* (2003), ao estudarem micro-organismos isolados de ambientes de mineração de carvão, observaram que 5,2% era resistente a concentrações superiores a 452,25 mg/L de níquel.

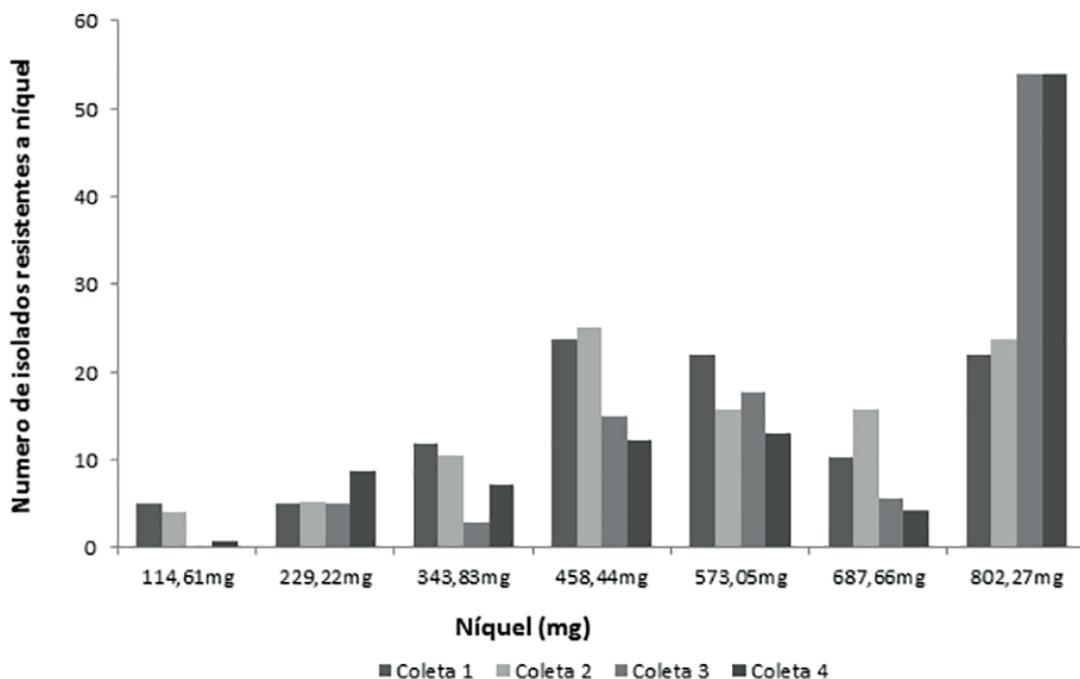


Figura 4. Perfil de resistência dos 410 isolados às diferentes concentrações do metal níquel nos quatro pontos de coleta.

Na terceira e quarta coletas observamos que 54% dos isolados foram resistentes a concentração de 802,27 mg/L. Cabral (2012), ao estudar isolados de amostras de solo e lodo de esgoto de ambientes contaminados com mercúrio, descreveu um exemplar de *Pseudomonas putida* resistente a concentrações de 1000 µM de NiCl₂. Abou-Shanab *et al.* (2007) observaram que 100% dos isolados de solos serpentina (caracterizados pelas altas concentrações de níquel) foram resistentes a 40mM de níquel.

Embora as concentrações de metais na água estejam nos limites da legislação vigente observou-se, ao longo das coletas, micro-organismos resistentes aos metais pesados. Ao compararmos resistência a antimicrobianos e metais pesados, observamos que todos os isolados resistentes a pelo menos cinco classes de antimicrobianos também foram resistentes às concentrações dos metais pesados testados. Logo, se faz necessário um controle nos índices de poluição, bem como aumentar a abrangência do tratamento do esgoto doméstico e industrial que deságua no Rio dos Sinos.

CONCLUSÕES

As bactérias isoladas do Rio dos Sinos apresentaram um elevado perfil de resistência aos antimicrobianos, onde 49,03% dos isolados foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos. Foram observados cinco isolados Gram negativos resistentes a imipenem, destes três foram isolados da quarta coleta, período de maior número de isolados multirresistentes e um isolado Gram positivo resistente à vancomicina foi oriundo da terceira coleta. Dos micro-organismos isolados nesse estudo, 44,39% apresentaram CIM acima de 802,27 mg/L de níquel; 40,97% CIM acima de 509,24 mg/L do metal cobre e 12,92% dos micro-organismos CIM acima de 707,04 mg/L de cromo.

Apesar do grande volume de dejetos suportados pelo Rio dos Sinos em toda sua extensão, a água tem qualidade satisfatória para maioria dos parâmetros e pontos avaliados ao longo do seu curso.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

ANA- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. 2012b. Panorama da

qualidade da águas superficiais.

ANDRADE, N.P.C., FILHO, F.M., CARRERA, M.V., JATOBÁ E SILVA, L., FRANCO, I., & DA COSTA, M.M. 2010. Microbiota bacteriana do *Macrobrachium amazonicum* do Rio São Francisco. *Acta Veterinaria Brasileira*, 4: 176-180.

BASU, M., BHATTACHARYA, A. & PAUL, K. 1999. Isolation and Characterization of Chromium-Resistant Bacteria from Tannery Effluents. *Environmental Contaminant Toxicology*, 58: 535- 542.

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

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

CABRAL, L. Isolamento de bactérias tolerantes e fatores que afetam a transformação de metilmercúrio por *Pseudomonas putida* V1 *in vitro*. 125. Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, UFRGS. 2012.

CANAL, N. 2010. Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos, RS. 98. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS. 2010

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) 2009. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. M100-S19*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

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

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

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

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AO MEIO AMBIENTE (FEPAM). 2009. *Relatório Sinos, Eventos de mortandade de peixes, Rio dos Sinos*. Segunda edição revisada e atualizada. Porto Alegre: FEPAM.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AO MEIO AMBIENTE (FEPAM). 2013. Disponível em http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade_sinos/sinos.asp. Acesso em 31.01.2013

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

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

HECK, K. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias isoladas de processo de compostagem. 109. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS, 2011.

ISAAC MARQUEZ, A.G., DAVILA, C.M.L., PECH, P.P.K. & SEGOVIA, P.T. 2004. Calidad sanitaria de los suministros de agua para consumo humano em Campache. *Revista de Salud Pública de México*, 36(6): 655-661.

JIMENEZ, R.S., DAL BOSCO, S. & CARVALHO, W.A. 2004. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural escolocita- influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. *Química Nova*, 27: 734-738.

- JORDÃO, C.L., SILVA, A.L., PEREIRA, J.L. & BRUNE, W. 1999. Contaminação por cromo de águas de rios provenientes de curtumes em Minas Gerais. *Química Nova*, 22: 47-52.
- KARBASIZAEI, V., BADAMI, N. & EMTIAZI, G. 2003. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *African Journal of Biotechnology*, 2: 379-383.
- KOCH, C.R., RIBEIRO, J.C., SCHNOR, O.H., ZIMMERMANN, B.S., MÜLLER, F.M., D'AGOSTIN, J., MACHADO, V. & ZHANG, L. 2008. Resistência antimicrobiana dos uropatógenos em pacientes ambulatoriais, 2000-2004. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41:277-281.
- KUMMERER, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere*, 75: 417-434.
- LIBÂNIO, P.A.C., CHERNICHARO, C.A.L. & NASCIMENTO, N.L. 2005. A dimensão da qualidade de água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 10: 219-228.
- MACOMBER, L. & HAUSINGER, R.P. 2011. Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics*, 3:1153-1162.
- MATYAR, F., AKKAN, T., UÇAK, Y. & ERASLAN, B. 2010. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environmental Monitoring Assessment*, 167: 309-320.
- MERTEN, G.H., MINELLA, J.P. 2002. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. *Revista de Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, 3: 33-38.
- MIRANDA, C.D. & CASTILHO, G. 1998. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. *The Science of the Total Environment*, 224: 167-176.
- MOURA, A.C., ASSUMPÇÃO, R.A.B. & BISCHOFF, J. 2009. Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do Rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006. *Arquivo do Instituto de Biologia*, 76(1): 17-22.
- NAIME, R. & FAGUNDES, R.S. 2005. Controle da qualidade da água do Arroio Portão, RS. *Pesquisa em Geociências*, 32: 27-35.
- NAIME, R. & NASCIMENTO, C.A. 2009a. Monitoramento físico, químico e microbiológico das águas do Arroio Pampa em Novo Hamburgo, RS. *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal*, 6(2): 410-432.
- NAIME, R. & NASCIMENTO, C.A. 2009b. Panorama do uso, distribuição e contaminação das águas superficiais no Arroio Pampa na Bacia do Rio dos Sinos. *Estudos Tecnológicos*, 5(1):101-120.
- NAIME, R. & NASCIMENTO, C.A. 2009c. Monitoramento de metais pesados do Arroio Pampa em Novo Hamburgo, RS. *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal*, 6(2): 433-450.
- OLIVEIRA, A.C. & SILVA, R.S. 2008. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, 10(1):189-197.
- OLIVEIRA, M.F., CORÇÃO, G. & VAN DER SAND, S.T. 2006. An evaluation of transient bacterial population in a polluted bathing site in Porto Alegre - Brazil. *Biociências*. 14(2):136-143.
- OLIVEIRA, D.V., CARVALHO, T., ZANIN, J.G., NACHTIGALL, G., MEDEIROS, A.W., FRAZZON, A.P.G. & VAN DER SAND, S.T. 2012. Qualidade da água e identificação de bactérias Gram-negativas isoladas do Arroio Dilúvio em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Evidência*, 12(1): 51-62.
- OLIVEIRA, J.P.W., SANTOS, R.N.S., PIBERNAT, C.C. & BOEIRA J.M.B. 2012. Genotoxicity and Physical Chemistry Analysis of waters from Sinos River (RS) using *Allium cepa* and *Eichhornia crassipes* as bioindicators. *Biochemistry and Biotechnology Reports*. 15-22.
- PASSIANOTO, C., CASTILHOS, D., CASTILHOS, R.M.V., LIMA, A.C.R. & LIMA, C.L.R. 2001. Atividade e biomassa microbiana no solo com a aplicação de dois diferentes lodos de curtume. *Revista Brasileira de Agrociência*, 7:125-130.
- PAZ, V.P.S., TEODORO, R.E.F. & MENDONÇA, F.F. 2000. Recursos hídricos, agricultura irrigada e meio ambiente. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 4(3):465-473.
- MINISTÉRIO PÚBLICO DO RIO GRANDE DO SUL. 2008. Divisão de Assessoramento Técnico Parecer-Documento DAT-MA Nº 0616/2008 Unidade de assessoramento ambiental e geoprocessamento das bacias hidrográficas.pp. 1-12. 2008.
- PINTO, K.C. Avaliação Sanitária das águas e areias as Baixada Santista, São Paulo. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2010.
- PONTES, D. S., PINHEIRO, F.A., LIMA-BITTENCOURT, C. I., GUEDES, R. L. M. CURSINO, L., BARBOSA, F., SANTOS, F.R., CHARTONE-SOUZA, E. & NASCIMENTO, A.M.A. 2009. Multiple Antimicrobial Resistance of Gram-Negative Bacteria from Natural Oligotrophic Lakes Under Distinct Anthropogenic Influence in a Tropical Region. *Microbiology Ecology*, 58:762-772.
- SCHNEIDER, R.N., NADVORNY, A. & SCHMIDT V. 2009. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. *Biotemas*, 22(3): 11-17.
- SILVEIRA, G.P., NOME, F., GESSER, J.C., SÁ, M.M., TERENCEI, H. 2006. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova*, 29(4): 844-855.
- SHAKOORI, A.R. & MUNEER, B. 2002. Copper-resistant bacteria from industrial effluents and their role in remediation of heavy metals in wastewater. *Folia Microbiology*, 47: 43-50.
- STRIEDER, M.N., RONCHI L.H., STENERT, C., SCHERER, R.T., NEISS U.G. 2006. Medidas biológicas e índices de qualidade da água de uma microbacia com poluição urbana e de curtumes no sul do Brasil. *Acta Biologica Leopoldensia*, 28: 17-24.
- SUNDAR, K., MUKHERJEE, A., SAQUID, M. & CHANDRASEKHARAN, N. 2011. Cr (III) bioremoval capacities of indigenous and adapted bacterial strains from Palar river basin. *Journal of Hazardous Materials*, 187:553-561.
- VICTORETTE, T.W.D.B. & BRENTANO, D.M. 2010. Qualidade da água da Bacia Hidrográfica do Rio Ratones, Florianópolis/SC, nas estações de primavera e verão. *Caderno de Publicações Acadêmicas*, 2(1): 44-52.