

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE
E RECURSOS HÍDRICOS**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS DE RECREAÇÃO
POR MEIO DA RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS
HETEROTRÓFICAS NÃO-COLIFORMES A DIFERENTES
ANTIMICROBIANOS**

Paula Thaís Ranzani de França

Itajubá (MG)
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE
E RECURSOS HÍDRICOS**

Paula Thaís Ranzani de França

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS DE RECREAÇÃO
POR MEIO DA RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS
HETEROTRÓFICAS NÃO-COLIFORMES A DIFERENTES
ANTIMICROBIANOS**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de Concentração: Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Orientador: Prof. Dr. Rogério Melloni

Itajubá (MG)
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE
E RECURSOS HÍDRICOS

Paula Thaís Ranzani de França

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS DE RECREAÇÃO
POR MEIO DA RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS
HETEROTRÓFICAS NÃO-COLIFORMES A DIFERENTES
ANTIMICROBIANOS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Melloni (orientador)

Profa. Dra. Ana Lúcia Fonseca

Profa. Dra. Marileia Chaves Andrade

Itajubá (MG)

2013

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram e acreditaram na conclusão desse projeto,
em especial aos meus pais Angelica e Rubens, que com paciência, amor,
carinho e incentivo tornaram possível a conclusão desta
importante etapa da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por me dar forças em todos os momentos.

À minha mãe, por todo apoio e incentivo moral e afetivo, pelo carinho, companheirismo e por nunca me deixar cair, nem nos momentos difíceis.

Ao meu pai, que apesar de todas as dificuldades, sempre se esforçou ao máximo para que eu concluísse o curso, sempre deixando bem claro seu orgulho por mim.

Aos meus irmãos, Bruno e Éric, por serem tão especiais e carinhosos, mesmo estando tão distantes fisicamente.

Ao Diego Noronha pelo apoio nas horas difíceis, pela ajuda durante as análises, pelo companheirismo incondicional em todos os momentos, por ser meu guia turístico regional e por suportar todos os muitos momentos de crises e dificuldades, sempre me dando ânimo para seguir em frente.

A todos os meus parentes que apoiaram a minha decisão e, em especial, meu primo William Ranzani, por todo o apoio nas horas difíceis, por estar comigo sempre que há oportunidade e por continuar sendo o meu companheiro de todas as horas desde a infância.

Aos meus filhos de quatro patas, por fazerem companhia em todos os momentos e por tornarem meus dias tão felizes.

Aos amigos da Turma de 2011, em especial à Ana Paula, Maria Cláudia e Priscila, que para sempre farão parte da minha história.

Aos docentes, por nos prepararem para ser bons profissionais e pela amizade, especialmente ao professor Rogério Melloni, pela paciência e orientação. Aos funcionários por manterem as instalações adequadas ao uso, em especial ao técnico Paulo Sérgio Marques, pela ajuda no laboratório,

Agradeço também à UNIFEI, ao IRN e à CAPES por permitirem que fosse possível a conclusão desse projeto.

RESUMO

É crescente a preocupação com o uso de fármacos antimicrobianos devido à sua grande permanência no ambiente, o que pode causar uma pressão seletiva na microbiota com consequente desenvolvimento de bactérias multirresistentes. Com o objetivo de avaliar a resistência de bactérias heterotróficas, isoladas de áreas de recreação na região sul de Minas Gerais, a diferentes antimicrobianos, foram realizadas coletas de amostras de água de rios e cachoeiras em cinco cidades desta região: Itajubá, Gonçalves, Brazópolis, Maria da Fé e Wenceslau Braz. Para a realização do trabalho foram selecionados aleatoriamente isolados de bactérias capazes de crescer em meio de cultura Plate Count Agar, após incubação a 35°C, antes da aplicação de antibiograma frente a doze antimicrobianos. Foi realizado um pós-teste confirmativo para diferenciação dos isolados em dois grupos, grupo I – bactérias heterotróficas (não pertencente ao grupo coliforme) – e grupo II – microrganismos pertencentes ao grupo coliforme. Dos 175 isolados pertencentes aos cinco pontos de coleta, 133 (76%) foram pertencentes ao grupo I, dos quais, 77,6% foram resistentes à penicilina. Em contrapartida, dentre os 133 isolados selecionados, nenhum foi resistente à gentamicina.. Foi observado que 75% do total dos isolados apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos, sendo considerados multirresistentes, e somente 10% foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Tais resultados evidenciam indiretamente a larga presença dos diferentes antimicrobianos nas águas de recreação estudadas e mostram a necessidade de estudos relacionados a sua origem e aos possíveis impactos na saúde coletiva.

Palavras-chave: Resistência a antimicrobianos. Bactérias heterotróficas. Bactérias multirresistentes.

ABSTRACT

There is growing concern about the use of antimicrobial drugs due to its great permanence in the environment, which may cause a selective pressure on microorganisms with subsequent development of multiresistant bacteria. Aiming to evaluate the resistance of heterotrophic bacteria isolated from recreation areas in southern Minas Gerais, to antimicrobials, water samples from rivers and waterfalls were collected, in five cities of the region: Itajubá, Gonçalves, Brazópolis, Maria da Fé and Wenceslau Braz. To this work, bacterial isolates, able to grow in Plate Count Agar culture medium, were randomly isolated after incubation at 35 ° C, before application of the antibiogram test with twelve antibiotics. It was conducted a post-confirmatory test for differentiation of isolates into two groups, Group I - heterotrophic bacteria (not belonging to the coliform group) - and group II - microorganisms belonging to the coliform group. From the 175 isolates belonging to five sampling points, 133 (76%) were belonging to group I, and 77.6% were resistant to penicillin. In contrast, among the 133 selected isolates, none was resistant to the antibiotic gentamicin. It was observed that 75% of the total isolates were resistant to two or more antibiotics, being considered multiresistant, and only 10% were sensitive to all antibiotics tested. These results show indirectly the large presence of antimicrobials in water recreation evaluated and show the need to study its origin and the possible public health impacts.

Keywords: Antimicrobial resistance. Heterotrophic bacteria. Multiresistant bacteria.

Lista de Ilustrações

- Figura 1-** Teia trófica microbiana (alça microbiana) demonstrando o retorno do carbono para a teia trófica aquática. Os vírus, quando infectam as células e promovem sua lise, liberam o COD para o ambiente. COD: Carbono orgânico dissolvido, CI: Carbono inorgânico. 18
- Figura 2 -** Seleção e transmissão de resistência a antimicrobianos. (A) Seleção das bactérias mutantes resistentes ao antibiótico, após a exposição. (B) Superinfecção com novas bactérias resistentes após a exposição ao antibiótico. 24
- Figura 3 -** Esquema representando todas as etapas desenvolvidas durante a metodologia. 30
- Figura 4 -** Representação esquemática da localização dos pontos amostrados 31
- Figura 5 -** Locais amostrados. **A-** Rio Sapucaí, Itajubá (P1), **B-** Cachoeira do Simão, Gonçalves (P2), **C-** Cachoeira do Alegre, Brazópolis (P3), **D-** Cachoeira do Cafundó, Maria da Fé (P4) e **E-** Rio Bicas, Wenceslau Braz (P5). 32
- Figura 6-** Imagens do ponto de coleta 1: Rio Sapucaí, Itajubá, MG. 32
- Figura 7-** Ponto de coleta 2: Cachoeira Gonçalves, MG (A). Visitação em dia de feriado (B). 33
- Figura 8-** Amostragem de água no ponto de coleta 3, cachoeira de Brazópolis, MG. 33
- Figura 9-** Amostragem de água no ponto de coleta 4: Cachoeira Maria da Fé, MG. 34
- Figura 10-** Amostragem de água no ponto de coleta 5, rio de Wenceslau Braz, MG. 34
- Figura 11-** Coleta das amostras de água em frascos estéreis. 34
- Figura 12-** Preparo das amostras para contagem total de bactérias heterotróficas. 35
- Figura 13 -** Contagem total de bactérias heterotróficas (foto A) e preparo da amostra para o teste de resistência a antimicrobianos, com a seleção de quatro colônias aleatórias, e sua caracterização fenotípica (fotos B e C) para posterior repicagem (foto D). 36
- Figura 14 -** Tubos inclinados contendo cepas selecionadas e cultivadas em meio de cultura Plate Count Agar para crescimento e posterior repicagem em placa de antibiograma 38
- Figura 15 -** Formação de halos de resistência. 39
- Figura 16-** Esquema do procedimento para confirmação das bactérias heterotróficas e seus determinados sub-grupos: GRUPO I: heterotrófica e GRUPO II: coliforme total, coliforme termotolerante e *E. coli*. 42
- Figura 17 -** Comparativo de eficiência entre os antimicrobianos analisados através quantidade de cepas resistentes, intermediárias ou sensíveis a cada um dos mesmos (n=132). 50
- Figura 18 -** Ocorrência de cepas multirresistentes no grupo I (bactérias heterotróficas n=132). 52
- Figura 19 -** Dendrograma de similaridade entre as trinta e seis colônias selecionadas no ponto 1 (P1, Rio Sapucaí, Itajubá), construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 60% de similaridade. 59
- Figura 20 -** Dendrograma de similaridade entre as trinta e seis colônias selecionadas no ponto 2 (P2, Cachoeira, Gonçalves), construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 60% de similaridade. 60

Figura 21 - Dendrograma de similaridade entre as trinta e seis colônias selecionadas no ponto 3 (P3, Cachoeira, Brazópolis), construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 60% de similaridade. 61

Figura 22 - Dendrograma de similaridade entre as trinta e seis colônias selecionadas no ponto 4 (P4, Cachoeira, Maria da Fé), construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 60% de similaridade. * Impossibilidade de realização do teste de resistência a antimicrobianos. 61

Figura 23 - Dendrograma de similaridade entre as trinta e seis colônias selecionadas no ponto 2 (P55, Rio, Wenceslau Braz), construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 60% de similaridade. * Impossibilidade de realização do teste de resistência a antimicrobianos. 62

Figura 24 – Porcentagem de isolados resistentes, de acordo com o antimicrobiano analisado, do grande grupo fenotípico selecionado para cada um dos cinco pontos de coleta. 63

Figura 25 – Análise comparativa dos isolados selecionados como representativos dos pontos de coleta. P1 – Rio Sapucaí, Itajubá, 12 isolados selecionados; P2 – Cachoeira do Simão, Gonçalves, 15 isolados selecionados; P3 – Cachoeira do Alegre, Brazópolis, 20 isolados selecionados; P4 – Cachoeira de Maria da Fé, 17 isolados selecionados e, P5 – Rio Bicas, Wenceslau Braz, 21 isolados, quanto à característica fenotípica de resistência a antimicrobianos, sendo classificado como sensível (isolado sensível aos 12 antimicrobianos testados), resistente (quando isolado resistente a pelo menos um antimicrobiano) e multirresistente (quando apresentou resistência a dois ou mais antimicrobianos). 64

Figura 26 - Dendrograma de similaridade entre as três repetições (R1, R2 e R3) de cada um dos 5 pontos de coleta (P1, P2, P3, P4 e P5), construído por meio do seu padrão de resistência aos antimicrobianos analisados. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com aproximadamente 90% de similaridade. 65

Lista de tabelas

- Tabela 1-** Diferentes classes de antimicrobianos e seus mecanismos de ação. 20
- Tabela 2 -** Localização dos pontos amostrados. 31
- Tabela 3 -** Conversão numérica dos dados obtidos para caracterização fenotípica das cepas selecionadas. 37
- Tabela 4 -** Relação dos antimicrobianos usados no teste de sensibilidade das bactérias heterotróficas e respectivos diâmetros de referência para padrão interpretativo, para cepas resistentes (R), intermediárias (I) e sensíveis (S). 39
- Tabela 5 -** Resultados da avaliação da densidade total de bactérias heterotróficas nos diferentes pontos de coleta. 43
- Tabela 6 -** Diâmetro dos halos de inibição formados para cada antimicrobiano testado (em mm) e sua caracterização em sensível (S), intermediária (I) e resistente (R). Cepas isoladas do ponto de coleta 1, P1RI- Rio Itajubá. 45
- Tabela 7 -** Diâmetro dos halos de inibição formados para cada antimicrobiano testado (em mm) e sua caracterização em sensível (S), intermediária (I) e resistente (R). Cepas isoladas do ponto de coleta 2, P2CG, Cachoeira Gonçalves. 46
- Tabela 8 -** Diâmetro dos halos de inibição formados para cada antimicrobiano testado (em mm) e sua caracterização em sensível (S), intermediária (I) e resistente (R). Cepas isoladas do ponto de coleta 3, P3CB – Cachoeira Brazópolis. 47
- Tabela 9 -** Diâmetro dos halos de inibição formados para cada antimicrobiano testado (em mm) e sua caracterização em sensível (S), intermediária (I) e resistente (R). Cepas isoladas do ponto de coleta 4, P4CMF – Cachoeira Maria da Fé. 48
- Tabela 10 -** Diâmetro dos halos de inibição formados para cada antimicrobiano testado (em mm) e sua caracterização em sensível (S), intermediária (I) e resistente (R). Cepas isoladas do ponto de coleta 5, P5RWB - Rio Wenceslau Braz. 49
- Tabela 11 -** Caracterização fenotípica das colônias selecionadas aleatoriamente para o teste de resistência aos antimicrobianos selecionados (cepas isoladas do ponto de coleta 1 (P1RI), Rio Sapucaí, Itajubá). 54
- Tabela 12 -** Caracterização fenotípica das colônias selecionadas aleatoriamente para o teste de resistência aos antimicrobianos selecionados. Cepas isoladas do ponto de coleta 2 (P2CG), Cachoeira, Gonçalves. 55
- Tabela13 -** Caracterização fenotípica das colônias selecionadas aleatoriamente para o teste de resistência aos antimicrobianos selecionados. Cepas isoladas do ponto de coleta 3 (P3CB), Cachoeira, Brazópolis. 56
- Tabela 14 -** Caracterização fenotípica das colônias selecionadas aleatoriamente para o teste de resistência aos antimicrobianos selecionados. Cepas isoladas do ponto de coleta 4 (P4CMF), Cachoeira, Maria da Fé. 57

Tabela 15 - Caracterização fenotípica das colônias selecionadas aleatoriamente para o teste de resistência aos antimicrobianos selecionados. Cepas isoladas do ponto de coleta 5 (P5RWB), Rio, Wenceslau Braz.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1	Bactérias Heterotróficas	15
3.1.1	Alça Microbiana (Microbial Loop)	17
3.1.2	Biofilme	18
3.2	Antibióticos	19
3.3	Água de Recreação	26
4	METODOLOGIA	30
4.1	Caracterização das Áreas de Estudo	31
4.2	Amostragem e Análises Laboratoriais	34
4.3	Isolamento e Contagem de Bactérias Heterotróficas	35
4.4	Teste de Resistência a Antimicrobianos	38
4.5	Teste Confirmativo para Bactérias Heterotróficas	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Bactérias Heterotróficas	43
5.2	Teste de Resistência a Antimicrobianos	44
5.3	Caracterização Fenotípica	55
5.3.1	Caracterização Ponto a Ponto	59
5.3.2	Análise Comparativa de Todos os Pontos	65
6	CONCLUSÕES	66
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 Introdução

O crescimento exponencial e desordenado da população acarreta uma degradação e alteração da composição da água, principalmente pelo despejo direto ou indireto de poluentes nos cursos hídricos.

São amplos os usos dos recursos hídricos e a queda na qualidade da água utilizada tanto para abastecimento público como para atividades recreativas implica num alto risco à saúde, uma vez que a mesma é responsável pela veiculação de um grande número de doenças como gastroenterites, cólera, conjuntivites e dermatites.

Uma forma frequente de monitoramento da qualidade da água – potabilidade e balneabilidade – é por meio da identificação e quantificação de grupos específicos de bactérias, por serem bons indicadores da presença de efluentes domésticos. Uma das propriedades bacterianas que podem também ser usadas para avaliar o impacto antropogênico no ambiente é a sua resistência a antibióticos. A observação de um grande número de bactérias heterotróficas resistentes a antimicrobianos num determinado ambiente indica uma mudança drástica nas condições ambientais devido a impactos, diretos ou não, de fatores não naturais.

São encontrados na natureza cepas de bactérias naturalmente resistentes a antimicrobianos, porém, quando bactérias com alto nível de resistência presentes no efluente doméstico são inseridas no ambiente, podem transferir tal resistência a outras bactérias ambientais. Além disso, o próprio agente antimicrobiano presente no ambiente exerce pressão seletiva sobre a microbiota ambiental. A habilidade de muitas espécies de bactérias, incluindo as patogênicas, de adquirir resistência aos agentes antimicrobianos tem se tornado um problema global, já que é o maior motivo de insucesso nos tratamentos de doenças infecciosas.

O estado de Minas Gerais possui uma grande quantidade de nascentes, rios e cachoeiras, os quais são comumente utilizados como fonte de lazer, principalmente em função da alta disponibilidade, do fácil acesso, e baixo custo na utilização dos mesmos. Em todo o território nacional, a qualidade destas águas tem sido definida pela Resolução CONAMA nº 274, de 29/11/2000, que trata das águas destinadas à balneabilidade (recreação de contato primário). No entanto, tal Resolução considera somente coliformes fecais e *E. coli* como variáveis microbiológicas, não considerando as demais bactérias heterotróficas como variável na determinação dos índices de qualidade de água.

Porém, sabe-se que a contaminação dos corpos hídricos não é causada somente por efluentes, seja doméstico ou industrial, mas há a preocupação atual de contaminação por disruptores endócrinos, tais como hormônios e antimicrobianos, os quais não são eliminados dos efluentes nas formas tradicionais de tratamento dos mesmos. Esta preocupação surge com o conhecimento do impacto que a excreção de tais fármacos pode provocar nestas águas e na microbiota a elas associadas, podendo, em alguns casos, promover o surgimento de bactérias multirresistentes ou superbactérias.

Tais bactérias, por pressão seletiva, se tornam resistentes a duas ou mais drogas diferentes, e, em contato com o organismo, mesmo não sendo um patógeno potencial, acaba prejudicando ou dificultando os tratamentos convencionais com antimicrobianos, e, impulsionando o desenvolvimento de drogas cada vez mais agressivas e com maior espectro de ação.

Nesse sentido, a identificação de cepas multirresistentes no ambiente natural pode ser utilizada como um indicativo de que o ambiente em questão está sofrendo pressão antropogênica, muitas vezes relacionada ao despejo inadequado de águas residuárias, falhas nos sistemas de coleta e destinação de efluente doméstico e pressão seletiva direta dos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de animais.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade ambiental de águas de recreação do sul de Minas Gerais por meio da resistência a antimicrobianos de bactérias heterotróficas, aplicando os resultados ao padrão de balneabilidade definido pela legislação vigente.

2.2 Objetivos específicos

Identificar locais utilizados para recreação de contato primário na região sul de Minas Gerais e quantificar bactérias heterotróficas em amostras de água selecionadas;

Caracterizar as colônias isoladas quanto aos aspectos fenotípicos culturais;

Determinar a resistência de bactérias isoladas a antimicrobianos específicos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Bactérias Heterotróficas

As bactérias podem ser consideradas organismos simples, unicelulares, procariotos que se reproduzem por divisão assexuada. O tempo de duplicação é baixo, levando cerca de duas horas na maioria dos ambientes aquáticos. Seu tamanho médio é de $1\mu\text{m}$, sendo visível em microscópio óptico de $0,2\mu\text{m}$ (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010). Em ambiente, é comum as células bacterianas serem encontradas associadas a outras células de mesma descendência parental, formando populações (MADIGAN; MARTINKO; PARKER 2004a). Em ambientes aquáticos, ocorrem em abundância de 10^6 células mL^{-1} , podendo chegar a 10^{10} células mL^{-1} em águas turvas ricas em compostos húmicos (THOMAZ, 1999).

As bactérias colonizam todos os ambientes terrestres, desde ambientes inóspitos, como as fossas abissais, ao sistema digestivo dos seres vivos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER 2004a), estando presentes no planeta há mais de 2 bilhões de anos (THOMAZ, 1999).

Elas podem ser classificadas de acordo com o formato celular, arranjo espacial, composição da parede celular, respiração e metabolismo (THOMAZ, 1999; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Metabolicamente, as bactérias podem ser divididas em dois grupos, *autotróficas* quimiossintetizantes ou fotossintetizantes, quando não utilizam compostos orgânicos como fontes de Carbono, sendo este proveniente, frequentemente, do gás carbônico presente no ambiente, ou *heterotróficas* quando requerem um ou mais compostos orgânicos como fontes de Carbono para o seu crescimento (MADIGAN; MARTINKO; PARKER 2004b).

As bactérias heterotróficas estão presentes em todos os tipos de ambientes: na água, no solo e no ar, e em relação simbiótica em organismos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER 2004b). Quando presentes no solo e na água, contribuem diretamente para a degradação e remineralização da matéria orgânica dissolvida presente nos ambientes (RECHE; PITTOL; FIUZA, 2010).

Todos os microrganismos potencialmente patogênicos como *Escherichia sp.*; *Klebsiella sp.*; *Enterobacter sp.*; *Citrobacter sp.*, são pertencentes ao grupo das bactérias heterotróficas. Os patógenos oportunistas são assim denominados por conseguirem infectar organismos previamente debilitados, como aqueles pertencentes aos gêneros *Klebsiella sp.*,

Pseudomonas sp., e *Aeromonas sp.*, os quais ocorrem naturalmente no solo, água e vegetação, e que podem causar infecções hospitalares em indivíduos previamente debilitados (ALLEN *et al.*, 2004).

As bactérias são frequentemente usadas para monitorar a qualidade do ambiente (Resolução CONAMA nº 274, de 29/11/2000), uma vez que, sob os efeitos dos fatores ambientais podem adquirir características específicas, e ainda, servirem como bons indicadores da presença de poluentes de origem doméstica (LOBOVA *et al.*, 2002). Isso é possível porque a célula microbiana é dinâmica e se adapta rapidamente a mudanças ambientais, algumas vezes alterando seu fenótipo e/ou genótipo (ROSZAK *et al.*, 1987).

Um grupo bastante conhecido de bactéria heterotrófica é o grupo dos coliformes. São bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae e são definidas, de acordo com a Norma Técnica L5. 214 (CETESB, 2007), como:

bacilos aeróbicos e anaeróbicos facultativos, Gram-negativos, não formadores de esporos, capazes de crescer na presença de concentrações relativamente elevadas de sais biliares e fermentar a lactose na temperatura de 35-37°C, com formação de ácido, gás e aldeído, em 24 a 48 horas.

Esse grupo tem especial importância na avaliação da eficiência do tratamento dos sistemas de distribuição de água. Isso se deve ao fato de que, dentro do grupo dos coliformes, a *Escherichia coli* é a única espécie encontrada unicamente no trato intestinal de humanos e animais de sangue quente, sendo usada, frequentemente, para avaliar a contaminação fecal de corpos hídricos (CETESB, 2007).

Como já mencionado, mesmo sendo todas as bactérias patogênicas, oportunistas e potencialmente patogênicas pertencentes ao grupo das bactérias heterotróficas, a legislação brasileira de balneabilidade (CONAMA, 2000) e de qualidade de água (CONAMA, 2005) só consideram como indicativos para determinação de qualidade densidades de bactérias do grupo coliforme.

Segundo Stelma Júnior *et al.* (2004) existe uma infinidade de bactérias heterotróficas presentes na água que não são conhecidas ou caracterizadas. Não há evidências de que tais bactérias possam causar problemas de saúde aos consumidores, porém, em altas densidades, elas podem se tornar patógenos oportunistas. Em estudo pioneiro, Le Chevallier e Mc Feters (1985) citam casos onde foram observadas a ocorrência de doenças transmitidas pela água após ou em conjunto à observação de altas densidades de bactérias heterotróficas em água

potável. Nesse mesmo estudo, observaram que a frequência de detecção de bactérias do grupo coliformes diminui à medida que as densidades de bactéria heterotrófica aumentam.

A função principal das bactérias heterotróficas, segundo Yanada *et al.* (2000) está no fluxo de energia do ciclo do carbono e na dinâmica trófica dos ambientes aquáticos. Por colonizarem todos os ambientes e apresentarem papel fundamental na decomposição e retorno dos nutrientes para os ambientes aquáticos e terrestres, serão apresentadas duas propriedades importantes do grupo.

3.1.1 Alça Microbiana (Microbial Loop)

Acreditava-se que o papel dos microrganismos em ambientes aquáticos fosse, principalmente, a decomposição das fezes dos macrorganismos no sedimento (HEWSON; FUHRMAN, 2008). Apesar de ter papel importante na decomposição, a partir da década de 80, estudos começaram a apontar que em ambientes aquáticos, em determinadas situações, a biomassa e produção secundária microbiana – síntese de novos compostos celulares bacterianos a partir de moléculas orgânicas obtidas do ambiente – superam à de fitoplâncton (THOMAZ, 1999; HEWSON; FUHRMAN, 2008).

Alguns grupos de bactérias heterotróficas são capazes de consumir o carbono orgânico dissolvido (COD), inacessível aos organismos heterotróficos, transformando-o em matéria orgânica particulada, que é consumida pelos demais organismos heterotróficos, promovendo o retorno do carbono à teia trófica (THOMAZ, 1999). Sendo assim, as bactérias contribuem significativamente para o balanço de carbono da teia trófica aquática (ANACLETO; GOMES, 2006).

Segundo Hewson e Fuhrman (2008), “a alça microbiana é um componente fundamental no ciclo do nitrogênio marinho em que vírus, procariotos e eucariotos unicelulares possuem papéis distintos”, sendo responsável, também, pela ciclagem da maior parte do carbono orgânico dos ecossistemas aquáticos (ANACLETO; GOMES, 2006).

Os microrganismos que compõem a alça utilizam como fonte de energia predominante as frações dissolvidas de carbono, o chamado Carbono Orgânico Dissolvido – COD. A origem do COD pode ser *autóctone*, proveniente principalmente do fitoplâncton, ou *alóctone*, proveniente da decomposição de vegetais terrestres (THOMAZ, 1999). O mesmo autor observa ainda que o COD autóctone é de fácil assimilação, sendo que 91% do total produzido podem ser assimilados em menos de uma hora, porém, o COD alóctone é constituído

principalmente de materiais húmicos, de difícil assimilação, tornando-se uma fonte constante e abundante de carbono.

Segundo Anacleto e Gomes (2006) a teia trófica microbiana (figura 1) consiste em tornar a matéria orgânica dissolvida disponível para níveis tróficos superiores através da absorção de COD pelas bactérias, as quais são predadas por flagelados, que são predados por ciliados, que servem de alimento para os microzooplâncton, predados por larvas de peixes, entrando, dessa forma, na teia trófica aquática. Fica claro, então, que as bactérias constituem a base, juntamente com o fitoplâncton, da teia trófica microbiana. O carbono orgânico, hipoteticamente perdido nas teias alimentares, é nela reincorporado pela *alça microbiana* (THOMAZ, 1999).

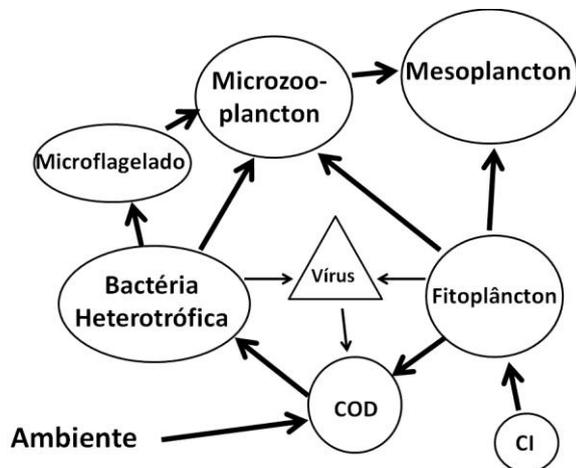


Figura 1- Teia trófica microbiana (alça microbiana) demonstrando o retorno do carbono para a teia trófica aquática. Os vírus, quando infectam as células e promovem sua lise, liberam o COD para o ambiente. COD: Carbono orgânico dissolvido, CI: Carbono inorgânico
Adaptado de Hewson e Fuhrman (2008).

3.1.2 Biofilmes

Assim como a participação na alça microbiana, outra propriedade importante do grupo das bactérias heterotróficas é a capacidade de formar biofilme. Biofilme pode ser definido como uma comunidade estruturada de bactérias heterotróficas capazes de se aderir e se desenvolver em um substrato orgânico ou inorgânico, formando uma microcolônia (TEIXEIRA; LEAL, 2002; PASTERNAK, 2009).

O biofilme tem importância médica, por ser capaz de se formar tanto em próteses sintéticas de transplantes – cateter, por exemplo – quanto em órgãos vitais, como nas válvulas cardíacas, prejudicando o tratamento de endocardites (PASTERNAK, 2009). Além disso, infecções causadas por biofilmes são virtualmente intratáveis, já que fornecem proteção ao

patógeno contra tratamentos antimicrobianos (TEIXEIRA; LEAL, 2002). Segundo Fricks-Lima *et al.* (2011) uma bactéria em biofilme chega a ser mil vezes mais resistente aos tratamentos com antibióticos do que quando em células livres, se tornando uma fonte permanente de infecção.

Da mesma forma, o biofilme possui importância sanitária, uma vez que pode ser formado nas tubulações de sistemas de distribuição sem manutenção. Devido a isso, a Portaria nº 2.914/2011 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), que dispõe sobre os padrões de potabilidade, no seu artigo 28, determina que “deve ser realizada [a determinação de bactérias heterotróficas] como um dos parâmetros para *avaliar a integridade do sistema de distribuição* [...] recomenda-se que não ultrapasse o limite de 500 UFC mL⁻¹”.

3.2 Antibióticos

Outra importante propriedade bacteriana é a capacidade de produzir antibióticos. Antibióticos ou antimicrobianos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, que têm a capacidade de interagir com microrganismos, podendo ter ação *bactericida* – quando promovem a lise celular – ou *bacteriostática* – quando inativam a célula (PAVIA, 1999). São as drogas mais bem sucedidas na farmacoterapia (MARTINEZ, 2009) sendo amplamente utilizadas no tratamento de infecções humanas, na medicina veterinária, na medicina preventiva e na agricultura (HIRSCH *et al.*, 1999; GANGLE, 2005). Existem, atualmente, várias classes de antimicrobianos com diferentes espectros de ação. De forma resumida, as principais classes de antimicrobianos, reconhecidos pela ANVISA, utilizadas para tratamentos infecciosos estão apresentadas no quadro 1 (BRASIL, 2010).

Tabela 1- Diferentes classes de antimicrobianos e seu espectro de ação.

CLASSE	AÇÃO	ESPECTRO DE AÇÃO	EXEMPLO	AUTORES
1. Penicilinas	β-Lactâmico - Bactericida (síntese da parede celular bacteriana)	Utilizados na maioria das infecções.	Penicilina, Amoxicilina, Ampicilina, Benzilpenicilina, Oxacilina.	FARINA, S. S. e BARBERATO FILHO, S.
2. Carbapênicos		Reservado para infecções hospitalares graves.	Imipeném + Cilastadina	TOLEDO, M. I. e FARINA, S. S.
3. Cefalosporinas		Preferencialmente em gram- positivos.	Cefalexina, Ceftazidima	DEL FIOL, F. S. e TOLEDO, M. I.
4. Aminoglicosídeos	Bactericidas. Alta toxicidade com baixo índice de resistência.	Pacientes internados com infecções graves. Gram-negativos aeróbios.	Amicacina, Estreptomicina, Gentamicina	TOLEDO, M. I. e FARINA, S. S.
5. Sulfonamídeos	Bacteriostáticos	Recomendados para infecções do trato urinário.	Nirtofurantoína, Sulfadiazina	DEL FIOL, F. S. e TOLEDO, M. I.
6. Macrolídeos	Bacteriostática ou bactericida	Recomendado em pacientes alérgicos a β- Lactâmicos. Microorganismos aeróbios.	Eritromicina, Azitromicina, Claritromicina	TOLEDO, M. I. e DEL FIOL, F. S.
7. Fluoroquinolonas	Bactericidas.	Principalmente gram-negativo aeróbio. Uso restritos em casos graves.	Ciprofloxacino	BARBERATO FILHO, S. e FARINA, S. S.
8. Glicopeptídeos	Bactericida	Gram-positivo	Vancomicina	TOLEDO, M. I. e BARBERATO FILHO, S.
9. Lincosamidas	Bacteriostáticos ou bactericidas	Gram-positivo	Cindamicina, Lincomicina	FARINA, S. S. e TOLEDO, M. I.
10. Tetraciclina	Bacteriostática	Amplo espectro com indicação de uso restrito	Tetraciclina, Doxiciclina	BARBERATO FILHO, S. e DEL FIOL, F. S.
11. Afenicóis	Bacteriostática	Amplo espectro de ação	Cloranfenicol	DEL FIOL, F. S. e BARBERATO FILHO, S.
12. Rifampicina	Bactericida	Usado em tratamento de tuberculose e Hanseníase	Rifampicina	SILVA, M.T.

Fonte: BRASIL (2010)

Uma das propriedades bacterianas que podem ser usadas para avaliar o impacto antropogênico no ambiente é a sua resistência a antimicrobianos (GONI-URRIZA *et al.*, 2000). Segundo Martinez (2009) o simples fato de encontrar organismos resistentes no ambiente não deve ser considerado como evidência de poluição por antimicrobianos ou genes de resistência. Porém, a observação de um grande número de bactérias heterotróficas resistentes a antimicrobianos num determinado ambiente indica uma mudança drástica nas condições ambientais devido a impactos diretos ou indiretos de fatores não naturais (LOBOVA *et al.* 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O uso crescente de agentes antimicrobianos para tratamento de doenças infecciosas ou na medicina preventiva (HIRSCH *et al.*, 1999; GANGLE, 2005; BRASIL, 2010) vem contribuindo para aumentar a biodisponibilidade dos agentes antimicrobianos no ambiente, tanto pela liberação direta dos mesmos – cultivos de aquicultura – como pela liberação indireta dos resíduos não metabolizados (PAVIA, 1999; HIRSCH *et al.*, 1999; MARTINEZ, 2009).

Atualmente, essa crescente entrada de substâncias antimicrobianas no ambiente tem se tornado motivo de preocupação, uma vez que são poluentes capazes de causar alterações nas comunidades microbianas ambientais, mesmo em baixas concentrações (HIRSCH *et al.*, 1999; MARTINEZ, 2009; KRISTIANSOON *et al.*, 2011; GARCIA-ARMISEN *et al.*, 2011). Segundo Garcia-Armisen *et al.* (2011) alguns antimicrobianos são capazes de inibir processos de desnitrificação microbiana no solo e inibir a produção primária de cianobactérias.

Alguns antimicrobianos são produzidos naturalmente por microrganismos, na intenção de diminuir o crescimento de microrganismos que competem pelos mesmos nutrientes, em uma relação antagonista. Da mesma forma, alguns microrganismos apresentam, naturalmente, mecanismos de resistência a determinados antimicrobianos (CHOI *et al.*, 2003; SOMMER; DANTAS, 2011), permitindo, assim, que haja uma competição por nutrientes com os produtores de antibióticos. Dessa forma, em situações naturais, em baixas concentrações, os antibióticos têm papel de regulador das comunidades microbianas (MARTINEZ, 2009).

Mas, o que vem sendo observado nas últimas décadas é um aumento considerável na concentração de antimicrobianos de origem sintética em ambientes aquáticos a qual pode se tornar um poluente, deixando de exercer a função reguladora para assumir função seletiva nas comunidades microbianas ambientais (MARTINEZ, 2009; GARCIA-ARMISEN *et al.*, 2011).

Mudryk (2005) observou que as substâncias antibióticas lançadas em ambientes hídricos também podem afetar fortemente a composição das comunidades bacterianas no ecossistema. Uma revisão mais atual feita por Sommer e Dantas (2011) mostra os riscos do uso prolongado de antimicrobianos, uma vez que os mesmos agem de forma inespecífica, atingindo também espécies da microflora natural de hospedeiros simbióticos – como o homem – alterando, assim, toda a estrutura da comunidade simbiótica e podendo causar danos ao hospedeiro.

Essa seleção atua de forma a promover a ativação de mecanismos de defesa dos microrganismos que, por meio de alterações fisiológicas e fenotípicas, desenvolvem mecanismos eficientes de “retirar a eficiência” dos antimicrobianos, tornando-se resistentes aos mesmos (MUDRYK, 2005; MARTINEZ, 2009; GARCIA-ARMISEN *et al.*, 2011; PIEREN; TIGGES, 2012). Assim, o antimicrobiano passa a selecionar as populações de microrganismos resistentes, reduzindo aqueles sensíveis à ação antimicrobiana. Ao longo do tempo, os microrganismos resistentes passam a ser capazes de transferir os genes que promovem resistência às células compatíveis, promovendo um aumento exponencial da quantidade de células resistentes no ambiente, mesmo que já não haja mais contaminação pelo antibiótico (GUILLEMONT, 1999; HEINEMANN, ANKENBAUER, AMÁBILE-CUEVAS, 2000; MARTINEZ, 2009).

Essa habilidade de muitas espécies de bactérias, incluindo as patogênicas, de adquirir resistência aos agentes antimicrobianos pela exposição por tempo prolongado aos antibióticos, é de extrema importância ambiental e médica (TENOVER; MCGOWAN, 1996) já que são o maior motivo de insucesso nos tratamentos de doenças infecciosas (DAVIES, 1994) e de desenvolvimento de patógenos multirresistentes virtualmente intratáveis (SOMMER; DANTAS, 2011).

A resistência a antibióticos é um problema multifatorial com implicações microbiológicas, terapêuticas, epidemiológicas e de saúde pública (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; CALVO, 2010). Segundo estudo pioneiro, Roszak (1987), em sua revisão, define a célula microbiana como em “estado dinâmico que se adapta prontamente às mudanças nos parâmetros ambientais por meio de uma grande variedade de adaptações fenotípicas e genotípicas”. Dessa forma, uma célula microbiana é capaz de responder prontamente à pressão seletiva imposta pelos agentes antimicrobianos, tornando-se resistente ao efeito dos mesmos.

Mundialmente, desde o início do uso dos antimicrobianos, no final de II Guerra Mundial, os microrganismos vêm desenvolvendo técnicas de inativação dos mesmos.

Segundo observado por Alanis (2005), as cepas de *Stafilococcus aureus* desenvolveram métodos naturais de inativação da penicilina em tempo recorde e em pouco mais de uma década já eram observadas cepas resistentes em centros de tratamento intensivo, em hospitais.

A *resistência* é uma forma de medir a diminuição da ação (de lise ou inativação celular) do antimicrobiano (FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011). Essa medida é feita através da *Concentração Inibitória Mínima* (CIM) que é definida por Martínez-Martínez e Calvo (2010) como sendo a concentração mínima de agente antimicrobiano que, em condições padronizadas, é capaz de inibir o crescimento de 10^5 bactérias.mL⁻¹.

Existem dois tipos de resistência, a *resistência intrínseca* que é a capacidade da célula microbiana de impedir a ação do antimicrobiano naturalmente, e a *resistência extrínseca* ou *adquirida* que é a capacidade da célula de inibir a ação do agente antimicrobiano, por meio de alterações fenotípicas e genotípicas (DAVIES, 1994; FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011). Dessa forma, o próprio agente antimicrobiano, quando presente em um ambiente, atua selecionando a subpopulação de organismos resistentes (com resistência intrínseca ou adquirida) promovendo o crescimento e a disseminação dessas cepas (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; CALVO, 2010).

De acordo com o diâmetro do halo de inibição formado, em culturas *in vitro*, seguindo as concentrações inibitórias mínimas para cada antibiótico, pode-se classificar a cepa em sensível, intermediária e resistente (FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011).

São considerados *sensíveis* os microrganismos que possuem uma CIM menor do que os limites padronizados, sendo eliminados, em caso de infecção, com a dosagem recomendada do antimicrobiano (NCCLS, 2003; FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011).

Os microrganismos considerados *intermediários* são os que, para uma total eliminação, em caso de infecção, precisem de uma dose mais elevada do antimicrobiano do que as definidas em protocolo (NCCLS, 2003; FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011).

As cepas classificadas como *resistentes* são as associadas ao insucesso nos tratamentos convencionais, uma vez que elas não são inibidas pelas concentrações sistêmicas do antibiótico quando administrado em doses normais. Possuem, assim, uma CIM elevada (NCCLS, 2003; FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011).

As infecções causadas por bactérias resistentes são difíceis de tratar e estão associadas aos casos de morbidade e mortalidade, principalmente em hospitais, onde o sistema imune dos pacientes já está debilitado (ALANIS, 2005; NTAGIOPOULOS *et al.*, 2007). Além disso, devido à dinâmica da célula microbiana, o fracasso em tratamentos de infecções com células

resistentes é maior do que o sucesso em tratamentos convencionais de infecções de bactérias sensíveis (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; CALVO, 2010).

A aquisição de resistência é dada de forma ativa, sob pressão seletiva do agente antimicrobiano (figura 2). Sendo assim, para se desenvolver a resistência ao antimicrobiano é necessária a presença do antibiótico que seja capaz de inibir a maioria das bactérias presentes na colônia e que esta colônia seja heterogênea geneticamente, de forma que pelo menos uma bactéria possua o gene de resistência, sobrevivendo ao agente antimicrobiano e disseminando seu gene de resistência com a multiplicação (ALANIS, 2005; FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011).

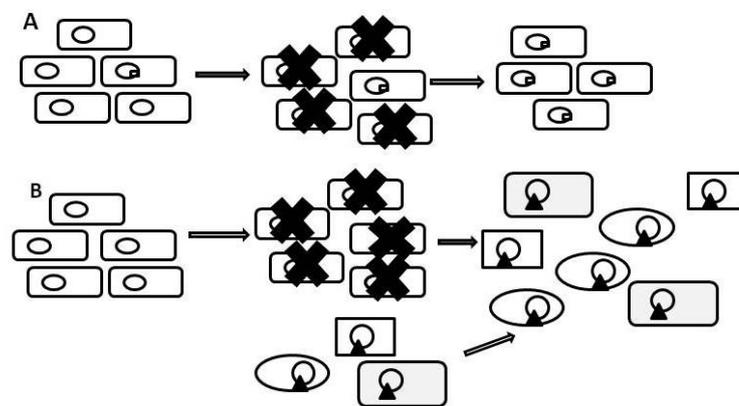


Figura 2 - Seleção e transmissão de resistência a antimicrobianos. (A) Seleção das bactérias mutantes resistentes ao antibiótico, após a exposição. (B) Superinfecção com novas bactérias resistentes após a exposição ao antibiótico.

Adaptado de Fraimow e Tsigrelis (2011).

Os genes de resistência podem ser transmitidos horizontalmente entre indivíduos de mesma espécie ou de espécies diferentes através de elementos genéticos extracromossômicos. Um dos principais elementos é o *plasmídeo*, fragmento de DNA circular extracromossômico com capacidade de autoduplicação, que pode ser trocado entre as células; os *transposons*, elementos genéticos móveis, que podem, através dos *íntegrans*, carregar a informação genética de resistência entre os cromossomos e o plasmídeo, facilitando tanto a fixação da resistência adquirida, como a possibilidade de transmiti-la (GOMES-LUS, 1998; HIRSCH *et al.*, 1999; ALANIS, 2005; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; CALVO, 2010; FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011).

A aquisição dos genes de resistência pode se dar por meio de três formas: pela conjugação, transformação ou transdução. A *conjugação* é a mais frequente delas, por consequência, a mais importante. Ela consiste na troca de plasmídeos conjugativos entre bactérias pareadas (independente da espécie). A *transformação* é a capacidade da bactéria

incorporar o DNA livre presente no ambiente no seu próprio genoma. E, por fim, a *transdução* é mediada por vírus bacteriófagos que, no momento da infecção, libera, junto com seu material genético para duplicação, os genes de resistência de uma bactéria resistente previamente infectada (GANGLER, 2005; ALANIS, 2005; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; CALVO, 2010; FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011; SOMMER; DANTAS, 2011). Em água, a transmissão de plasmídeos conjugativos contendo o gene de resistência pode ocorrer em menos de um minuto e a resistência ao antimicrobiano pode se espalhar rapidamente entre as bactérias (MUDRYK, 2005). O maior agravante desses mecanismos é que, segundo Fraimow e Tsigrelis (2011), os diferentes genes de resistência são geralmente agrupados nos íntegrans, o que resulta na transferência e aquisição resistência a diversas classes de antibióticos.

Uma vez adquirido o gene de resistência, esse vai afetar processos bioquímicos na célula, promovendo alterações que inativam o agente antimicrobiano. Os principais mecanismos de inativação são: (i) diminuição da permeabilidade aos antimicrobianos na membrana citoplasmática, evitando a sua entrada no citoplasma; (ii) modificação do princípio ativo do antibiótico por meio da produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico (um exemplo é a produção de enzimas β -lactamases, que resulta na resistência aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos); (iii) eliminação ativa do antibiótico que ocorre quando o microrganismo é capaz de desenvolver um mecanismo de transporte ativo de expulsão do antibiótico do citoplasma antes que atinja concentrações tóxicas (mecanismo comumente observado nas bactérias resistentes a tetraciclinas) e (iv) modificação do receptor, quando o alvo intracelular é alterado pela bactéria, resultando na falta de ligação e consequente inativação do efeito do antibiótico (ALANIS, 2005; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; CALVO, 2010).

As bactérias aquáticas frequentemente mostram múltipla resistência (DAVIS, 1992). Isso porque, nos últimos anos, para superar o problema de resistência aos antimicrobianos utilizados nos tratamentos de doenças infecciosas, tem ocorrido um aumento do uso de drogas de diferentes mecanismos de ação combinadas para potencializar a eficácia nos tratamentos, resultando em bactérias resistentes ou multirresistentes a tais drogas (GANGLER, 2005; SOMMER; DANTAS, 2011).

A grande quantidade de bactérias multirresistentes vem obrigando uma alteração nos protocolos de tratamentos de doenças infecciosas, sendo, algumas vezes necessária a combinação de duas ou mais drogas de diferentes espectros de ação (PIEREN; TIGGES, 2012).

Segundo estudo desenvolvido por Halling-Sorensen *et al.* (1998), quando as bactérias resistentes a vários antibióticos presentes no ambiente entram novamente no trato gastrointestinal humano podem promover nova transferência de resistência e, assim, comprometer a eficácia dos regimes terapêuticos tradicionais. Porém, em estudo apresentado por Sommer e Dantas (2011), não houve transferência lateral de genes resistentes no trato gastrointestinal de humanos que ingeriram cepas resistentes, mas “somente” multiplicação das mesmas. Isso mostra que, não somente a transferência de genes de resistência, mas também a capacidade das cepas resistentes de se estabelecerem com a microbiota autóctone pode comprometer a eficácia dos tratamentos.

3.3 Água de recreação

A água por muito tempo considerada como um bem infinito, sempre foi determinante no desenvolvimento das sociedades e na qualidade de vida da população. Foi devido ao regime hídrico de grandes rios, como o Nilo, que a população humana deixou de ter hábitos nômades, já que era possível realizar o plantio de alimentos nas grandes planícies de inundação. Além do uso imprescindível para alimentação e consumo – mantenedores da vida no planeta – a água também é usada para dessedentação de animais, higiene e como fonte de lazer, possibilitando a prática de diversos esportes (DOMÉNECH-SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

Devido a sua vital importância, a preocupação com a qualidade das reservas de água doce vem crescendo nas últimas décadas, uma vez que está ocorrendo um aumento exponencial da população, com conseqüente aumento da ocupação irregular ou imprópria de áreas de mananciais (RIBEIRO *et al.*, 2009). Esse crescimento desordenado dos centros urbanos provoca uma degradação da qualidade e modificação na composição da água, gerada, principalmente, pelo despejo de poluentes nos cursos hídricos (SILVA *et al.*, 2008; TERRA *et al.*, 2008).

Assim, o controle da qualidade desses corpos hídricos é de suma importância uma vez que existe uma gama de doenças que pode ser causada por patógenos de veiculação hídrica, tais como gastroenterites, conjuntivites, dermatites, doenças das vias respiratórias, entre outros (FREITAS *et al.*, 2001; KAMIZOULIS; SALIBA, 2004; PIANETTI *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2007; DOREVITCH *et al.*, 2011). A presença de microrganismos em águas continentais é natural, porém a alta concentração de microrganismos potencialmente patogênicos, tais como coliformes fecais e *Escherichia coli*, aumentam os riscos à saúde

humana, mesmo quando essa água é utilizada para recreação de contato primário (DOREVITCH et al. 2011) ou para irrigação (BERALDO; FARACHE FILHO, 2011).

Nesse sentido, são importantes os estudos relacionando qualidade de água de recreação e a saúde humana (DOMÉNECH-SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Segundo os mesmos autores, as águas destinadas à recreação podem ser naturais não tratadas, como rios, praias e cachoeiras; ou artificiais e tratadas como em piscinas .

Segundo estudo desenvolvido por Dorevitch *et al.* (2011), águas destinadas à recreação, quando contaminadas, representam um sério risco à saúde pública, principalmente entre os banhistas que possuem contato direto – natação – devido à grande ingestão de água durante essas atividades. Apesar de necessário, determinar os padrões de qualidade de águas de recreação, segundo Kamizoulis e Saliba (2004), é uma atividade complexa, uma vez que o risco de contaminação depende do tempo de exposição, do tipo de atividade, da faixa etária e do estado de saúde dos banhistas.

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente, por meio do artigo segundo da Resolução nº 357/2005, classifica e dá diretrizes de balneabilidade dos corpos hídricos naturais, classificando as águas destinadas à recreação de acordo com seus usos:

XXX - recreação de contato primário: contato direto e prolongado com a água (tais como natação, mergulho, esqui-aquático) na qual a possibilidade do banhista ingerir a água é elevada;

XXXI – recreação de contato secundário: refere-se aquela associada a atividades em que o contato com a água é esporádico ou acidental e a possibilidade de ingerir água é pequena, como na pesca e na navegação (tais como no iatismo);

O artigo quarto da Resolução CONAMA nº 357/2005 classifica as águas doces naturais em quatro classes, além da classe especial, e dá as diretrizes de usos para cada uma delas:

Art. 4º As águas doces são classificadas em:

I - classe especial: águas destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção;
- b) a preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e,
- c) a preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.

II - classe 1: águas que podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado;
- b) a proteção das comunidades aquáticas;
- c) a recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000;
- d) a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e
- e) a proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

III - classe 2: águas que podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional;
- b) a proteção das comunidades aquáticas;

c) a recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000;

d) a irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e

e) a aquicultura e a atividade de pesca.

IV - classe 3: águas que podem ser destinadas:

a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado;

b) a irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;

c) a pesca amadora;

d) a recreação de contato secundário; e

e) a dessedentação de animais.

V - classe 4: águas que podem ser destinadas:

a) a navegação; e

b) a harmonia paisagística.

Os padrões de qualidade, assim como a classificação das águas, devem ser monitorados pelo Poder Público (CONAMA, 2005). Além de todos os atributos físico-químicos e biológicos, a que dispõe a Norma, devem-se realizar análises microbiológicas, onde os limites máximos variam de acordo com as classes dos corpos hídricos:

Art. 14. As águas doces de classe 1 observarão as seguintes condições e padrões:

I - condições de qualidade de água:

[...]

g) coliformes termotolerantes: para o uso de recreação de contato primário deverão ser obedecidos os padrões de qualidade de balneabilidade, previstos na Resolução CONAMA nº 274, de 2000. Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 200 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais, de pelo menos 6 amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. A *E. Coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente;

[...]

Art 15. Aplicam-se as águas doces de classe 2 as condições e padrões da classe 1 previstos no artigo anterior, a exceção do seguinte:

[...]

II - coliformes termotolerantes: para uso de recreação de contato primário deverá ser obedecida a Resolução CONAMA nº 274, de 2000. Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 (seis) amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. A *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente;

[...]

Como pode ser observado, os limites microbiológicos recomendados para água de recreação devem seguir o que está disposto na Resolução CONAMA nº 274 (2000), que define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. Assim, as águas doces, salobras e salinas destinadas à balneabilidade (recreação de contato primário) são classificadas em duas categorias: própria e imprópria, sendo a primeira ainda subdividida em excelente, muito boa e satisfatória, em função de sua carga microbiana (coliformes fecais e *E. coli*).

Apesar da necessidade de controle da qualidade dos corpos hídricos superficiais, segundo o Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM, 2012), no primeiro trimestre de 2012 foi observado que 77% das amostras estavam com seus limites de coliforme termotolerante ultrapassados, o que, segundo o Instituto, pode ser devido ao lançamento de esgoto sanitário nos corpos de água e/ou à falta de manejo adequado do solo, principalmente pelos setores agrícola e minerário.

Tendo em vista o contexto atual de classificação e manutenção da qualidade das águas continentais, assim como a grande importância na preocupação com a contaminação dos ambientes naturais com substâncias potencialmente poluidoras, o presente estudo visa reforçar a importância do grupo das bactérias heterotróficas para a qualidade ambiental e saúde pública.

4 Metodologia

Um esquema da metodologia desenvolvida para este trabalho pode ser observado na figura 3. O detalhamento de cada etapa será dado em seguida.

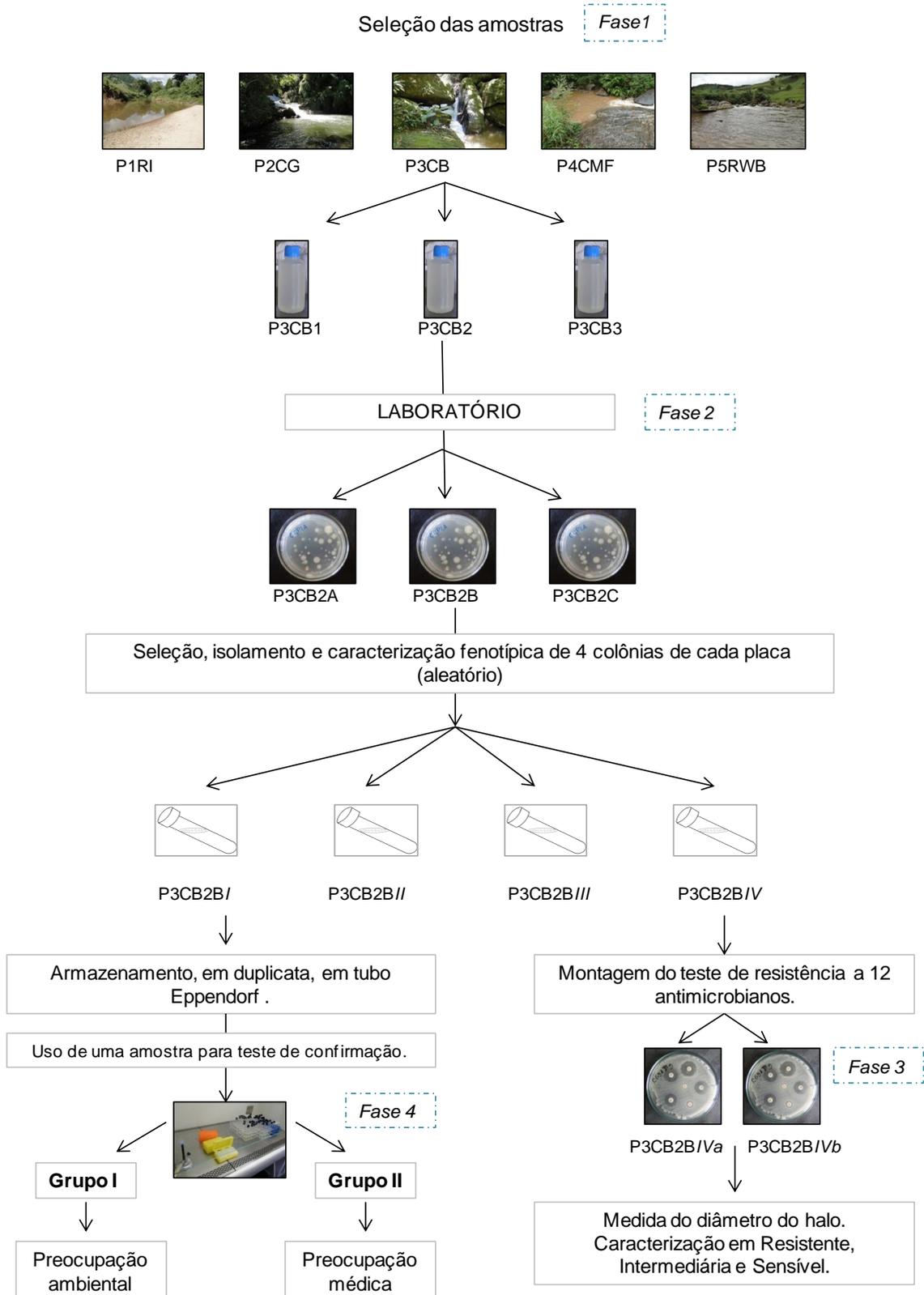


Figura 3 - Esquema representando todas as etapas desenvolvidas durante a metodologia.

4.1 Caracterização das áreas de estudo

A fase 1 da metodologia consistiu no levantamento das áreas a serem amostradas e na coleta de dados para análise.

As amostras destinadas à análise microbiológica foram coletadas no período de janeiro a março de 2011, em rios e cachoeiras de cinco cidades (pontos de coleta) da região Sul de Minas Gerais (Figura 4, tabela 1), sendo elas, Itajubá, Gonçalves, Brazópolis, Maria da Fé e Wenceslau Braz (Figura 5). Tais cidades foram selecionadas de acordo com a proximidade do laboratório e a disponibilidade e facilidade de acesso aos locais de recreação.

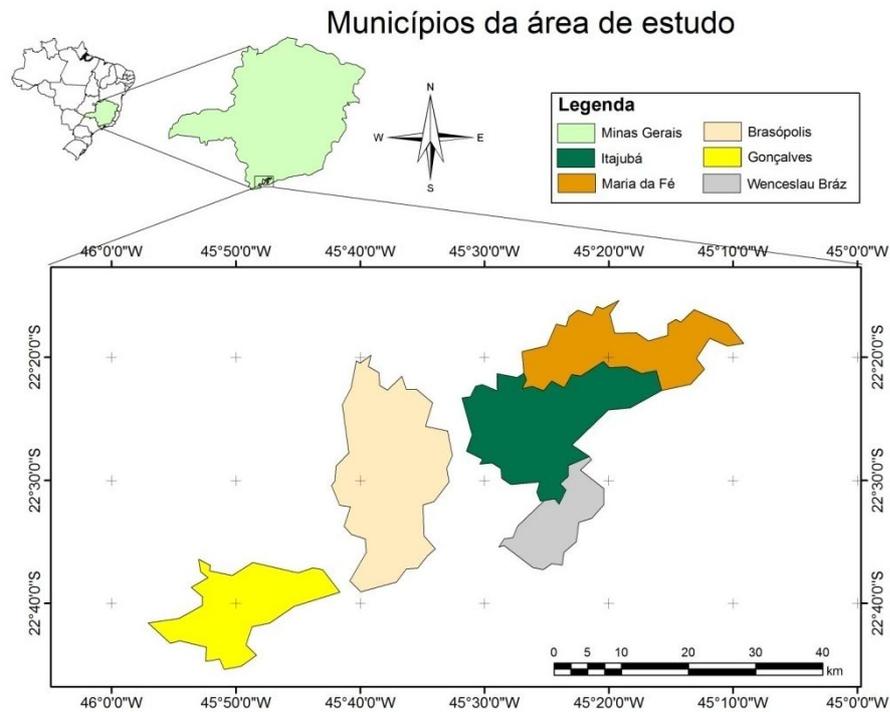


Figura 4 - Representação esquemática da localização das cidades dos pontos de coleta. .

Tabela 2 - Localização dos pontos amostrados.

PONTOS AMOSTRADOS		
PONTO	Cidade	Tipo
P1RI	Itajubá	Rio
P2CG	Gonçalves	Cachoeira
P3CB	Brazópolis	Cachoeira
P4CMF	Maria da Fé	Cachoeira
P5RWB	Wenceslau Braz	Rio

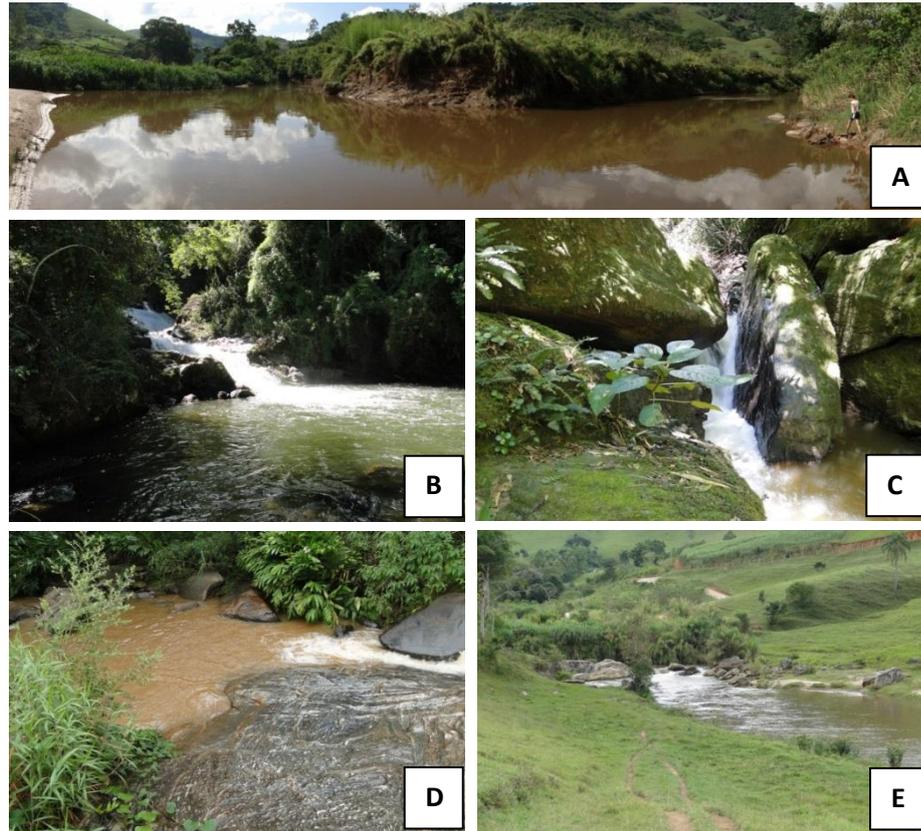


Figura 5 - Locais amostrados. **A**- Rio Sapucaí, Itajubá (P1), **B**- Cachoeira do Simão, Gonçalves (P2), **C**- Cachoeira do Alegre, Brazópolis (P3), **D**- Cachoeira do Cafundó, Maria da Fé (P4) e **E**- Rio Bicas, Wenceslau Braz (P5).

O ponto de coleta 1, com coordenadas $22^{\circ}28'33''\text{O}$ e $45^{\circ}23'47''\text{S}$, é uma praia formada no Rio Sapucaí (Figura 6), localizado na cidade de Itajubá, próximo à divisa com a cidade de Delfim Moreira. O local é bastante frequentado pela população, consistindo numa importante área de lazer nos dias mais quentes. Como possui curso lântico, com variação de profundidade de acordo com a sua calha e acúmulo de areia, é frequentado por pessoas de todas as idades.



Figura 6- Imagens do ponto de coleta 1: Rio Sapucaí, Itajubá, MG.

Os pontos de coleta 2 ($22^{\circ}41'02''\text{O}$ e $45^{\circ}50'57''\text{S}$), 3 ($22^{\circ}32'05''\text{O}$ e $45^{\circ}39'10''\text{S}$) e 4 ($22^{\circ}19'26''\text{O}$ e $45^{\circ}18'22''\text{S}$) são cachoeiras localizadas, respectivamente nas cidades de Gonçalves, Brazópolis e Maria da Fé. A cachoeira do Simão, em Gonçalves (Figura 7A), diferente das demais, possui um fluxo intenso de águas cristalinas. A cachoeira toda se desenvolve sobre sedimento rochoso, não formando praias. Porém, por ser muito próxima do centro da cidade e de fácil acesso, é muito frequentada pela população local e pelos turistas (Figura 7B), uma vez que a cidade é um dos pontos turísticos da região.

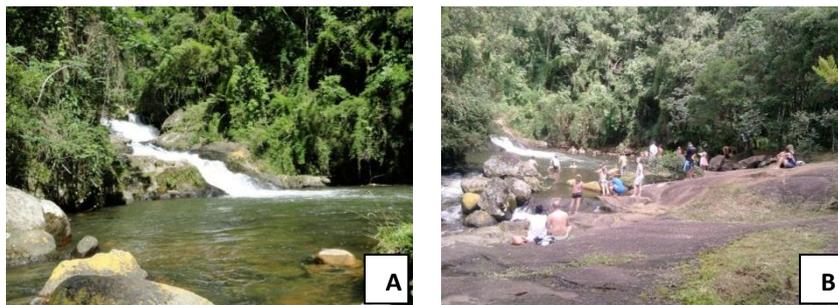


Figura 7- Ponto de coleta 2: Cachoeira Gonçalves, MG (A). Visitação em dia de feriado (B).

A cachoeira do Alegre, em Brazópolis (Figura 8), assim como a cachoeira do Cafundó, em Maria da Fé (Figura 9), possuem curso de água barrenta, com fundo lodoso em meio às rochas e formação de pequenas praias arenosas. Porém, devido ao difícil acesso, a frequência à cachoeira de Brazópolis é menor do que a dos outros pontos de coleta. Já a frequência de visitação na cachoeira da cidade de Maria da Fé é intensa (figura 9), uma vez que a mesma corta o Bairro do Cafundó, mesmo este não sendo muito populoso, a cachoeira tem um papel importante nas atividades recreativas da população local.



Figura 8- Amostragem de água no ponto de coleta 3, cachoeira de Brazópolis, MG.



Figura 9- Amostragem de água no ponto de coleta 4: Cachoeira Maria da Fé, MG.

O ponto de coleta 5 ($22^{\circ}31'43''\text{O}$ e $45^{\circ}24'21''\text{S}$) é um rio localizado na cidade de Wenceslau Braz (Figura 10), possui curso lântico, fundo arenoso, formando praias e água turva. Pelo fácil acesso, permite que a população use para a prática de recreação. Além disso, está localizado entre duas áreas de pasto, servindo também, para a dessedentação do gado.



Figura 10- Amostragem de água no ponto de coleta 5, rio de Wenceslau Braz, MG.

É importante ressaltar que, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2008), cerca de 90% de todo o esgoto coletado no estado de Minas Gerais não possui tratamento sanitário, e, menos de 5% do esgoto da zona rural do estado é destina às redes coletoras.

4.2 Amostragem e análises laboratoriais

As amostras de água foram coletadas em frascos estéreis (Figura 11), em triplicata, e mantidas refrigeradas até chegada ao laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Itajubá, onde foram conduzidas as análises. Quando possível, a amostra foi coletada na isóbata de 1 m a fim de evitar interferências amostrais das zonas de turbulência.



Figura 11- Coleta das amostras de água em frascos estéreis.

4.3 Isolamento e contagem de bactérias heterotróficas

A fase 2 da metodologia consistiu nas primeiras análises laboratoriais. Para a avaliação da densidade de bactérias heterotróficas das amostras de água coletadas em cada ponto de amostragem, foi utilizada uma alíquota de 0,1 mL de amostra, sem diluição, em placas de Petri contendo meio de cultura Plate Count Agar (APHA, 1999), em triplicata, por meio do método de cultivo de semeadura ou “spread plate” (APHA, 1999). Os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar e as amostras incubadas em estufa bacteriológica por 48 ± 3 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (CETESB, 2006), conforme figura 12.

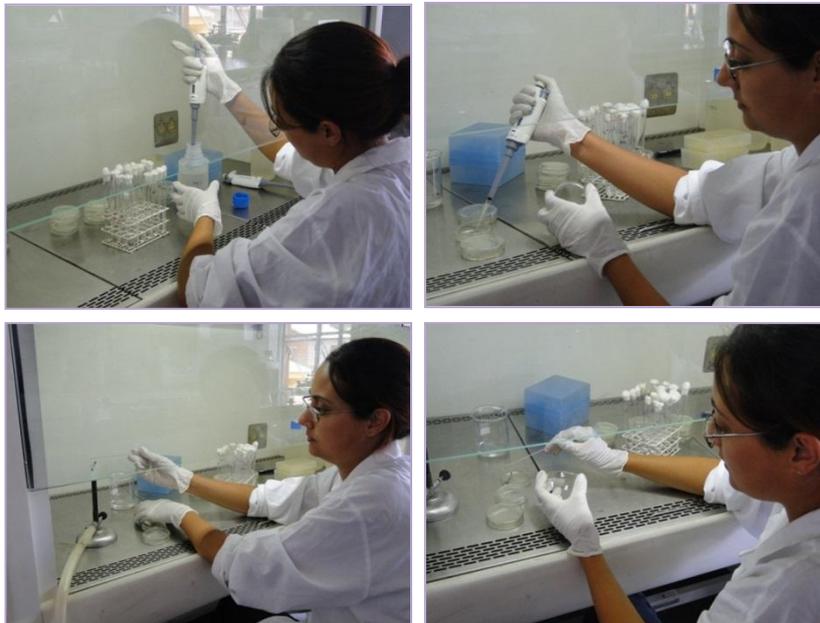


Figura 12- Preparo das amostras para contagem total de bactérias heterotróficas.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem do total de colônias formadas nas placas a fim de obter a densidade total de bactérias heterotróficas para cada ponto de

coleta (Figura 13A). De posse dos dados de densidade de bactérias heterotróficas, foi utilizada estatística descritiva para cálculo da média, desvio padrão, variância de amplitude, utilizando o *software* Excel®.

Para cada placa de cultivo, foram selecionadas, aleatoriamente, quatro colônias para repicagem (Figura 13D) e posterior teste de resistência a antimicrobianos. No momento da repicagem foram feitas as caracterizações fenotípicas de cada uma das colônias escolhidas, passando a ser denominados isolados (Figura 13B e 13C).

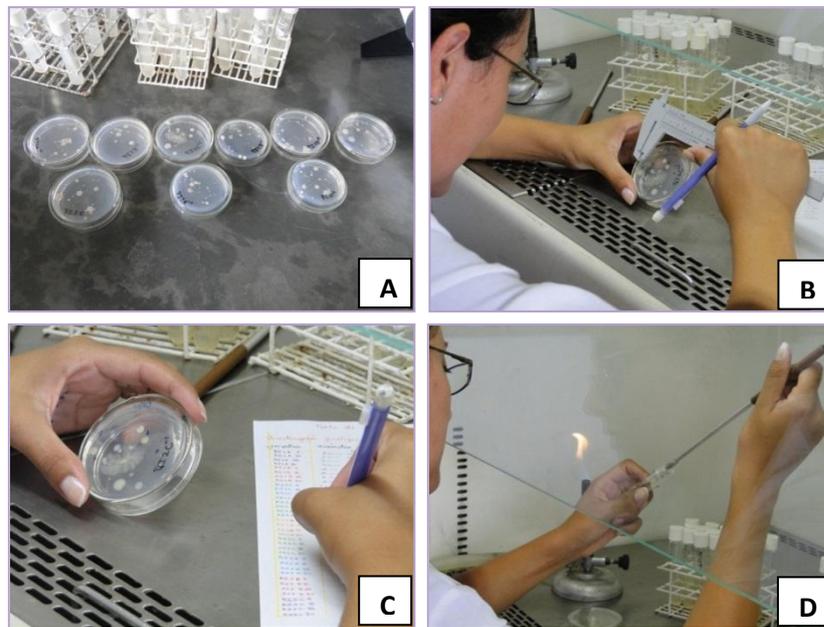


Figura 13 - Contagem total de bactérias heterotróficas (foto A) e preparo da amostra para o teste de resistência a antimicrobianos, com a seleção de quatro colônias aleatórias, e sua caracterização fenotípica (fotos B e C) para posterior repicagem (foto D).

Para cada isolado selecionado foi medido o diâmetro da colônia e observados os seguintes aspectos fenotípicos: forma da colônia, produção ou não de goma, borda, cor e elevação da colônia. Todos esses dados foram tabulados e convertidos em valores numéricos conforme tabela 2 e utilizados em análise de agrupamento e geração de dendrogramas de similaridade, por meio do método “Complete linkage e Distância Euclidiana (EVERITT, 1993), pelo *software* Statistica” (1995). Essa metodologia teve como objetivo identificar e utilizar cepas de diferentes grupos fenotípicos culturais na fase 3 – resistência a antimicrobianos.

Tabela 3- Conversão numérica dos dados obtidos para caracterização fenotípica das cepas selecionadas.

Caracterização fenotípica das cepas selecionadas									
Forma		Produção de goma		Bordas		Cor		Elevação	
Carac.	VN	Carac.	VN	Carac.	VN	Carac.	VN	Carac.	VN
Circular	1	Sim	1	Inteira	1	Branco amarelado	1	Convexa	1
Puntiforme	2	Não	2	Erosada	2	Rosa	2	Elevada	2
				Filamentosa	3	Salmão	3	Convexa alta	3
				Ondulada	4	Branca	4	Ondulada	4
				Lobada	5	Amarela	5		
						Laranja	6		
						Amarelo gema	7		
						Amarelo limão	8		
						Branco transparente	9		
						Amarelo transparente	10		
						Transparente	11		
						Roxa	12		

Carac.: Característica e *VN:* Valor numérico.

Após a medição de todas as características apresentadas, as cepas foram incubadas por 48 ± 3 horas a $35^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ (CETESB, 2006) em tubo inclinado contendo meio de cultura Plate Count Agar (APHA, 1999 – figura 14).



Figura 14 - Tubos inclinados contendo cepas selecionadas e cultivadas em meio de cultura Plate Count Agar para crescimento e posterior repicagem em placa de antibiograma.

4.4 Teste de resistência a antimicrobianos

A fase 3 da metodologia consistiu na realização do teste de resistência a antimicrobianos das cepas isoladas, que foi determinada por meio do método de Kirby-Bauer de disco-difusão (BAUER, 1966), recomendado pelo *National Comitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003).

Cada cepa isolada foi testada frente aos seguintes antimicrobianos: Amoxicilina (AMO) 30 µg, Ampicilina (AMP) 10 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5 µg, Cloranfenicol (CLO) 30 µg, Eritromicina (ERI) 15 µg, Estreptomicina (EST) 10 µg, Gentamicina (GEN) 10 µg, Penicilina (PEN) 10 UI, Rifampicina (RIF) 30 µg, Vancomicina (VAN) 30 µg, Azitromicina (AZI) 15 µg e Tetraciclina (TET) 30 µg. A escolha dos antimicrobianos foi dada com base na literatura relacionada e investigações de frequência de uso no hospitais da rede pública de saúde.

Para a realização do teste de resistência a antimicrobianos, as cepas isoladas e repicadas para os tubos inclinados foram ressuspensas com o auxílio de uma alça de platina estéril para tubos contendo 10 ml de água estéril em quantidade suficiente de inóculo para atingir o grau de turvação 0,5 comparativamente ao tubo padronizado de acordo com a escala de McFarland (Bier, 1994). Após esse processo, com o auxílio de um swab, foi realizado o inóculo em placas de petri com meio de cultura Plate Count Agar (APHA, 1999). Imediatamente após este processo, foram acrescentados às placas, com auxílio de uma pinça, os discos com antimicrobianos e foram incubados novamente à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (CETESB, 2006) por 48 ± 3 horas.

Foi realizado um teste para cada cepa selecionada. A cepa foi incubada em duas placas contendo 6 discos de antimicrobianos em cada uma, conforme mostrado na figura 15.

Após o período de incubação, com o auxílio de um paquímetro, foram medidos os halos de inibição ao redor de cada disco com antimicrobiano (incluindo o tamanho do disco – Figura 15). Os diâmetros obtidos foram comparados aos diâmetros de referência para padrão interpretativo fornecidos pelo fabricante, Sensifar-Cefar, para definir o grau de resistência a tal antimicrobiano: sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R), conforme apresentado na Tabela 3.

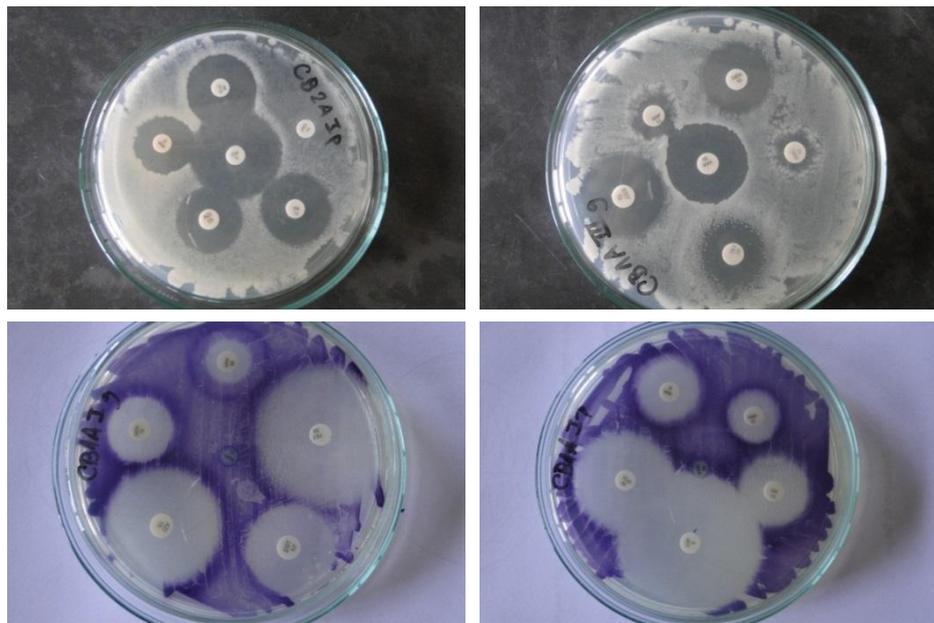


Figura 15 - Formação de halos de resistência.

Tabela 4 - Relação dos antimicrobianos usados no teste de sensibilidade das bactérias heterotróficas e respectivos diâmetros de referência para padrão interpretativo, para cepas resistentes (R), intermediárias (I) e sensíveis (S).

Antibacteriano		Tabela Padrão para Interpretação de Halos de Inibição		
		Padrão interpretativo (mm)		
		Resistente	Intermediário	Sensível
Penicilina	(PEN)	≤ 14	15 - 28	≥ 29
Amoxicilina	(AMO)	≤ 13	14 - 28	≥ 29
Ampicilina	(AMP)	≤ 13	14 - 28	≥ 29
Eritromicina	(ERI)	≤ 13	14 - 22	≥ 23
Clorafenicol	(CLO)	≤ 12	13 - 28	≥ 29
Rifampicina	(RIF)	≤ 16	17 - 19	≥ 20
Vancomicina	(VAN)	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Estreptomicina	(EST)	≤ 11	12 - 14	≥ 15
Ciprofloxacina	(CIP)	≤ 15	16 - 20	≥ 21
Gentamicina	(GEN)	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Azitromicina	(AZI)	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Tetraciclina	(TET)	≤ 11	12 - 28	≥ 29

Fonte: Adaptado de Sensifa-cefar (2012).

4.5 Teste confirmativo para bactérias heterotróficas

A quarta e última fase da metodologia foi o teste confirmativo para bactérias heterotróficas. Para comprovar que as cepas escolhidas eram de bactérias heterotróficas não pertencentes ao grupo coliforme, foi realizado um pós-teste de confirmação. Para isso, adotou-se a técnica de tubos múltiplos, descrita pela Norma Técnica L5.214 da CETESB (2007). Para interpretação dos resultados, foi proposto neste trabalho uma subdivisão do grupo das bactérias heterotróficas em dois grupos, sendo eles: *GRUPO I heterotróficas*, que inclui todos os gêneros de bactérias com metabolismo heterotrófico, com exceção das pertencentes ao grupo coliforme, e *GRUPO II Coliforme*, que inclui representantes dos grupos (i) coliformes totais, (ii) coliformes termotolerantes e (iii) *E.coli*.

A técnica de tubos múltiplos consiste em inocular cada cepa selecionada, com o auxílio de uma alça de inoculação, em tubo de ensaio correspondente contendo caldo lactosado como meio de cultura. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Após esse período, foi realizada a primeira leitura, sendo considerados como resultados positivos, os tubos que apresentaram formação de gás no tubo de Durham invertido. Os tubos que apresentaram resultado negativo foram reincubados por mais 24 ± 2 horas, quando foi efetuada a segunda leitura. Os tubos que apresentaram resultado negativo na segunda leitura foram desprezados e a cepa incubada considerada do *GRUPO I heterotrófica* (Figura 16).

Imediatamente após a leitura, todos os tubos que apresentaram resultado positivo no caldo lactosado foram submetidos à confirmação em caldo verde brilhante. Para essa confirmação, as culturas positivas em caldo lactosado foram homogeneizadas e, com o auxílio da alça de inoculação, transferido um inóculo para o tubo contendo o caldo verde brilhante, evitando-se a película superficial. Todos os tubos de caldo verde brilhante foram incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Da mesma forma, foram realizadas duas leituras, após 24 ± 2 horas e 48 ± 3 horas, para os tubos que apresentaram resultado negativo na primeira leitura. Assim como para o teste com caldo lactosado, foram considerados resultados positivos os tubos que apresentaram formação de gás no tubo de Durham invertido, sendo as cepas consideradas do *GRUPO II, coliformes totais*. Os tubos que apresentaram resultado negativo foram descartados e as cepas consideradas do *GRUPO I heterotrófica* (Figura 16).

Para realizar a diferenciação das bactérias do *GRUPO II em coliforme termotolerante* e *E. coli*, um inóculo do tubo contendo caldo verde brilhante com resultado positivo foi

transferido para um tubo contendo caldo EC como meio de cultura, mantido previamente a 44,5°C por 30 minutos. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Após esse período realizou-se a leitura, sendo considerado como resultado positivo os tubos que apresentaram formação de gás no tubo de Durhan invertido, sendo as cepas consideradas do grupo *coliforme termotolerante*. Após a leitura, todos os tubos foram submetidos à luz fluorescente de comprimento de onda de 365 nm, em ambiente escuro, onde os tubos que apresentaram fluorescência azul foram considerados positivos para *E. coli*. As cepas dos tubos que não apresentaram formação de gás ou fluorescência foram consideradas do grupo *coliforme total*. Um esquema do procedimento para confirmação das bactérias heterotróficas e seus determinados sub-grupos pode ser visto na figura 16.

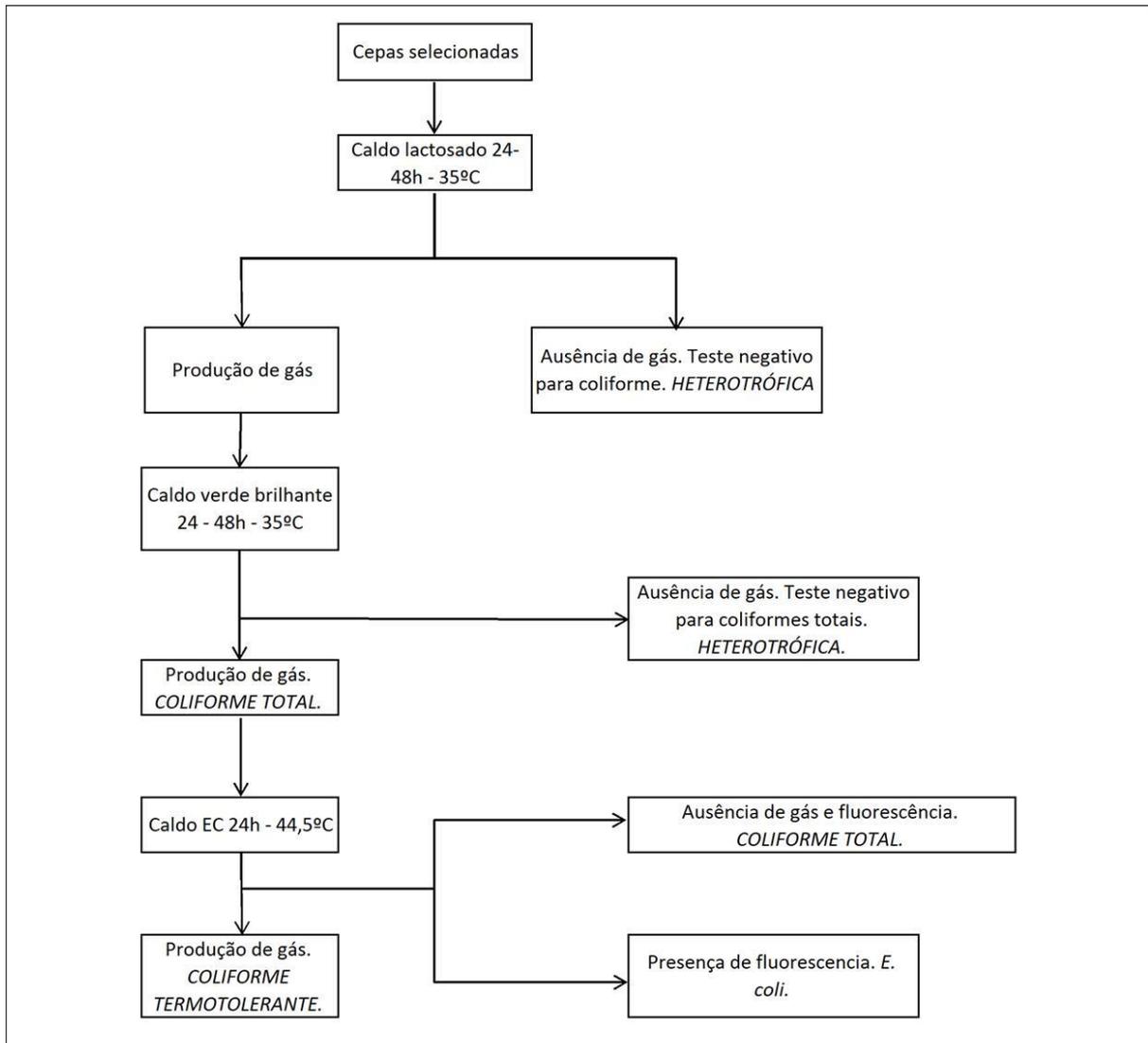


Figura 16- Esquema do procedimento para confirmação das bactérias heterotróficas e seus determinados sub-grupos: GRUPO I: heterotrófica e GRUPO II: coliforme total, coliforme termotolerante e *E. coli*. Adaptado de CETESB (2007).

5 Resultados e Discussão

5.1 Bactérias heterotróficas

Os resultados da avaliação da densidade total de bactérias heterotróficas nos diferentes pontos de coleta estão apresentados na tabela 4.

Tabela 5 - Resultados da avaliação da densidade total de bactérias heterotróficas nos diferentes pontos de coleta.

Ponto de coleta*	Média	Amplitude	Desvio padrão	Variância
	----- UFC mL ⁻¹ -----	-----		
P1RI	360,0	280,0 - 416,6 (136,6)	58,2	5077,3
P2CG	757,8	630,0 - 990,0 (360,0)	164,5	40581,8
P3CB	1397,8	1293,3 - 1476,7 (183,4)	77,0	8892,3
P4CMF	4337,8	3880,0 - 4996,7 (1116,7)	477,5	342067,3
P5RWB	873,3	1153,3 - 1376,7 (223,4)	66,7	8888,4

* Onde: P1RI – Ponto 1 Rio Itajubá, P2CG – Ponto 2 Cachoeira Gonçalves, P3CB – Ponto 3 Cachoeira Brasópolis, P4CMF – Ponto 4 Cachoeira Maria da Fé e P5RWB – Ponto 5 Rio Wenceslau Braz.

Maiores médias de densidade de bactérias heterotróficas foram obtidas nos pontos 4 e 3, seguidos pelos pontos 5, 2 e, finalmente, o ponto 1, com o menor valor, porém os dados obtidos estão dentro dos valores esperados de densidade entre 10^5 e 10^8 células por mL de amostra. Uma maior variação de amplitude nos dados amostrados ocorreu nos pontos P2CG e P4CMF, ambos ambientes de cachoeira.

Essa variação dos dados nos diferentes locais amostrados pode ser explicada pela dinâmica hídrica, uma vez que as réplicas foram coletadas de forma a abranger toda a área utilizada para recreação. Tanto a cachoeira de Gonçalves (P2) como a cachoeira de Maria da Fé (P4) são extensas, com ambientes variando de corredeira a piscinas naturais, o que explica a variação na densidade de bactérias heterotróficas encontrada em cada réplica. A cachoeira de Brasópolis (P3) possui um curso d'água estreito e pouca variação de ambientes, assim como os rios, o que explica a maior homogeneidade dos dados amostrados entre as réplicas. Vale ressaltar que tanto a Resolução CONAMA nº 274, de 29/11/2000, como a Deliberação Normativa COPAM nº 10 (1986) não determinam padrões de contagem de bactérias heterotróficas para a classificação de balneabilidade.

5.2 Teste de resistência a antimicrobianos

Foram isolados 180 cepas, porém, durante o processo de repicagem, houve perda de 5 cepas, sendo que para a análise de resistência a antimicrobianos foram utilizados 175 isolados, dentro daqueles obtidos nos cinco pontos de coleta.

No entanto, após aplicação do teste confirmativo de tubos múltiplos (figura 17), dos 175 isolados analisados, 132 (ou 76%) foram considerados do Grupo I (heterotróficas) e 42 (24%) do Grupo II (coliforme total e termotolerante). Segundo LeChevallier e McFeters (1985), quando as densidades de bactéria heterotrófica excedem valores de 500 a 1000 UFC mL⁻¹, os métodos de cultivo de semeadura em placa de petri contendo meio de cultura pouco seletivo (PCA) desfavorecem o crescimento de bactérias do grupo coliforme, uma vez que há uma maior competição por nutrientes e as bactérias do grupo coliforme são menos competitivas e mais seletivas. Os representantes do grupo coliforme são mais susceptíveis a efeitos secundários do que as demais heterotróficas, além do que, muitas vezes, requerem condições distintas de incubação, o que explica a baixa densidade de bactérias do grupo II.

Quanto ao teste de resistência aos antibióticos, os resultados obtidos para o diâmetro do halo formado em cada colônia selecionada frente aos diferentes antimicrobianos estão apresentados nas tabelas 6, 7, 8, 9 e 10, para aquelas obtidas nos pontos 1 a 5, respectivamente. Nessas tabelas, cada colônia foi classificada em resistente, intermediária ou sensível, de acordo com o padrão anteriormente apresentado na tabela 3.

Tabela 6 - Diâmetro dos halos de inibição formados para cada antimicrobiano testado (em mm) e sua caracterização em sensível (S), intermediária (I) e resistente (R). Cepas isoladas do ponto de coleta 1, P1RI- Rio Itajubá.

Amostra	PEN	Diâmetro dos halos de resistência (mm) (P1)																						
		AMO	AMP	ERI	CLO	RIF	VAN	EST	CIP	GEN	AZI	TET												
RI1HAI	..	R	18	I	22	I	14	I	30	S	27	S	21	S	24	S	27	S	19	S	34	S	23	I
RI1HAII	16	I	22	I	24	I	21	I	32	S	22	S	11	R	26	S	32	S	24	S	33	S	28	I
RI1HAIII	..	R	..	R	..	R	11	R	33	S	21	S	17	S	21	S	27	S	19	S	20	S	11	R
RI1HAIV	..	R	..	R	13	R	12	R	34	S	22	S	19	S	23	S	36	S	19	S	24	S	32	S
RI1HBI	14	R	26	I	29	S	17	I	34	S	48	S	28	S	29	S	24	S	17	S	27	S	40	S
RI1HBII	29	S	25	I	36	S	19	I	42	S	11	R	18	S	26	S	46	S	25	S	40	S	39	S
RI1HBIII	38	S	34	S	34	S	29	S	32	S	13	R	25	S	21	S	20	I	22	S	32	S	38	S
RI1HBIV	..	R	..	R	12	R	24	S	28	I	14	R	10	R	23	S	17	I	22	S	28	S	29	S
RI1HCI	20	I	34	S	30	S	26	S	29	s	31	S	22	S	24	S	20	I	24	S	33	S	35	S
RI1HCII	..	R	8	R	9	R	13	R	32	s	24	S	20	S	19	S	36	S	24	S	26	S	19	I
RI1HCIII	..	R	27	I	27	I	..	R	30	s	19	I	12	R	19	S	36	S	19	S	17	I	31	S
RI1HCIV	..	R	..	R	..	R	24	S	28	I	..	R	23	S	21	S	18	I	19	S	27	S	33	I
RI2HAI	10	R	25	I	26	I	18	I	34	s	50	S	19	S	24	S	28	S	20	S	16	I	47	S
RI2HAII	20	I	25	I	36	S	42	S	40	s	52	S	34	S	34	S	40	S	32	S	44	S	46	S
RI2HAIII	26	I	24	I	30	S	26	S	30	s	40	S	24	S	26	S	32	S	24	S	24	S	39	S
RI2HAIV	..	R	16	I	18	I	15	I	33	s	23	S	10	R	24	S	36	S	22	S	27	S	35	S
RI2HBI	28	I	34	S	41	S	25	S	32	s	13	R	23	S	11	R	19	I	19	S	27	S	35	S
RI2HBII	..	R	..	R	25	I	20	I	39	s	31	S	19	S	27	S	25	S	21	S	36	S	41	S
RI2HBIII	..	R	18	S	20	I	13	R	30	s	23	S	8	R	24	S	39	S	21	S	28	S	31	S
RI2HBIV	..	R	..	R	8	R	..	R	28	I	14	R	21	S	17	S	22	S	18	S	21	S	32	S
RI2HCI	..	R	..	R	12	R	..	R	29	s	17	I	9	R	17	S	37	S	17	S	27	S	31	S
RI2HCII	15	I	23	I	26	I	10	R	34	s	25	S	12	R	26	S	36	S	23	S	28	S	29	S
RI2HCIII	46	S	40	S	44	S	32	S	44	s	30	S	50	S	26	S	64	S	30	S	50	S	60	S
RI2HCIV	34	S	38	S	32	S	30	S	40	s	10	R	15	I	21	S	44	S	24	S	48	S	46	S
RI3HAI	8	R	28	I	31	S	18	I	35	s	30	S	18	S	25	S	28	S	24	S	21	S	42	S
RI3HAII	..	R	20	I	25	I	21	I	46	s	32	S	19	S	30	S	62	S	29	S	40	S	44	S
RI3HAIII	18	I	25	I	27	I	28	S	33	s	28	S	20	S	23	S	33	S	23	S	35	S	21	I
RI3HAIV	..	R	15	I	20	I	23	S	42	s	23	S	23	S	28	S	44	S	24	S	46	S	42	S
RI3HBI	..	R	..	R	..	R	30	S	36	s	..	R	11	R	28	S	44	S	29	S	42	S	38	S
RI3HBII	9	R	29	S	33	S	13	R	26	I	21	S	14	R	23	S	40	S	19	S	26	S	30	S
RI3HBIII	..	R	..	R	..	R	22	I	19	I	14	R	13	R	30	S	46	S	26	S	40	S	38	S
RI3HBIV	..	R	..	R	20	I	34	S	39	s	23	S	10	R	29	S	44	S	31	S	46	S	48	S
RI3HCI	..	R	9	R	15	I	15	I	33	s	20	S	16	I	22	S	46	S	19	S	28	S	30	S
RI3HCII	..	R	..	R	12	R	9	R	31	s	18	I	18	S	20	S	33	S	18	S	20	S	29	S
RI3HCIII	36	S	42	S	50	S	14	I	56	s	44	S	25	S	30	S	28	S	28	S	28	S	52	S
RI3HCIV	..	R	29	S	30	S	15	I	42	s	33	s	23	S	30	S	35	S	30	S	29	S	30	S

Tabela 7 - Diâmetro dos halos de inibição formados para cada antimicrobiano testado (em mm) e sua caracterização em sensível (S), intermediária (I) e resistente (R). Cepas isoladas do ponto de coleta 2, P2CG, Cachoeira Gonçalves.

Amostra	Diâmetro dos halos de resistência (mm)(P2)																							
	PEN	AMO	AMP	ERI	CLO	RIF	VAN	EST	CIP	GEN	AZI	TET												
P2CG1AI	..	R	..	R	9	R	12	R	34	S	22	S	18	S	22	S	27	S	21	S	10	R	31	S
P2CG1AII	..	R	17	I	22	I	17	I	36	S	23	S	16	S	25	S	38	S	23	S	31	S	35	S
P2CG1AIII	10	R	13	R	15	I	25	S	26	I	22	S	26	S	26	S	35	S	20	S	23	S	22	I
P2CG1AIV	8	R	14	I	13	R	21	I	22	I	17	I	23	S	23	S	30	S	20	S	19	S	25	I
P2CG1BI	..	R	26	I	30	S	48	S	44	S	34	S	20	S	23	S	50	S	22	S	32	S	42	S
P2CG1BII	8	R	12	R	18	I	18	I	32	S	42	S	16	I	26	S	37	S	17	S	23	S	40	S
P2CG1BIII	29	S	40	S	40	S	14	I	42	S	15	R	12	R	26	S	58	S	22	S	38	S	42	S
P2CG1BIV	..	R	24	I	26	I	15	I	35	S	29	S	22	S	18	S	44	S	19	S	28	S	34	S
P2CG1CI	28	I	31	S	36	S	..	R	34	S	16	R	7	R	24	S	34	S	19	S	20	S	36	S
P2CG1CII	15	I	15	I	15	I	..	R	42	S	20	S	7	R	24	S	37	S	19	S	19	S	27	I
P2CG1CIII	22	I	18	I	40	S	10	R	38	S	14	R	8	R	22	S	48	S	19	S	26	S	40	S
P2CG1CIV	..	R	..	R	..	R	..	R	28	I	23	S	..	R	23	S	40	S	24	S	..	R	29	S
P2CG2AI	..	R	20	I	28	I	26	S	56	S	40	S	22	S	28	S	40	S	20	S	38	S	44	S
P2CG2AII	..	R	8	R	8	R	22	I	33	S	26	S	18	S	16	S	40	S	18	S	31	S	35	S
P2CG2AIII	..	R	..	R	..	R	13	R	37	S	28	S	20	S	38	S	40	S	27	S	52	S	50	S
P2CG2AIV	24	I	29	S	36	S	25	S	30	S	24	S	19	S	16	S	27	S	17	S	29	S	34	S
P2CG2BI	..	R	..	R	24	I	15	I	35	S	24	S	18	S	22	S	33	S	23	S	23	S	37	S
P2CG2BII	25	I	40	S	42	S	14	I	46	S	13	R	8	R	26	S	54	S	19	S	34	S	40	S
P2CG2BIII	26	I	28	I	28	I	26	S	16	I	36	S	28	S	26	S	42	S	26	S	28	S	40	S
P2CG2BIV	7	R	9	R	12	R	19	I	19	I	18	I	20	S	21	S	28	S	18	S	17	I	23	I
P2CG2CI	..	R	..	R	24	I	22	I	24	I	25	S	12	R	25	S	50	S	24	S	36	S	40	S
P2CG2CII	..	R	..	R	..	R	..	R	17	I	16	R	13	R	14	I	8	R	14	I	21	S	11	R
P2CG2CIII	..	R	8	R	11	R	19	I	23	I	16	R	21	S	22	S	29	S	18	S	18	S	21	I
P2CG2CIV	30	S	36	S	42	S	..	R	37	S	20	S	11	R	24	S	50	S	19	S	28	S	36	S
P2CG3AI	8	R	9	R	13	R	19	I	21	I	17	I	22	S	22	S	29	S	20	S	17	I	21	I
P2CG3AII	16	I	32	S	31	S	17	I	36	S	14	R	..	R	18	S	42	S	19	S	35	S	34	S
P2CG3AIII	7	R	8	R	11	R	19	I	18	I	16	R	21	S	19	S	24	S	18	S	16	S	21	I
P2CG3AIV	8	R	11	R	13	R	20	I	20	I	19	I	23	S	22	S	28	S	20	S	18	S	22	I
P2CG3BI	12	R	20	I	25	I	13	R	25	I	19	I	17	S	20	S	30	S	18	S	23	S	30	S
P2CG3BII	8	R	23	I	34	S	20	I	45	S	34	S	17	S	30	S	54	S	22	S	42	S	48	S
P2CG3BIII	..	R	28	I	40	S	26	S	50	S	30	S	22	S	24	S	48	S	23	S	35	S	48	S
P2CG3BIV	..	R	14	I	26	I	8	R	34	S	19	I	8	R	22	S	36	S	18	S	19	S	36	S
P2CG3CI	..	R	11	R	18	I	8	R	23	I	16	R	..	R	22	S	33	S	17	S	28	S	34	S
P2CG3CII	13	R	24	I	34	S	..	R	42	S	25	S	25	S	24	S	40	S	22	S	24	S	40	S
P2CG3CIII	..	R	..	R	..	R	11	R	17	I	18	I	13	R	13	I	8	R	16	S	25	S	13	I
P2CG3CIV	..	R	18	I	24	I	11	R	34	S	19	I	21	S	20	S	40	S	20	S	25	S	33	S

Tabela 8 - Diâmetro dos halos de inibição formados para cada antimicrobiano testado (em mm) e sua caracterização em sensível (S), intermediária (I) e resistente (R). Cepas isoladas do ponto de coleta 3, P3CB – Cachoeira Brazópolis.

Amostra	Diâmetro dos halos de resistência (mm) (P3)																							
	PEN	AMO	AMP	ERI	CLO	RIF	VAN	EST	CIP	GEN	AZI	TET												
P3CB1AI	..	R	..	R	17	I	22	I	31	S	19	I	13	R	24	S	43	S	19	S	34	S	41	S
P3CB1AII	30	S	28	I	36	S	44	S	33	S	35	S	30	S	27	S	40	S	22	S	40	S	45	S
P3CB1AIII	..	R	9	R	13	R	23	S	24	I	19	I	23	S	24	S	30	S	19	S	21	S	17	I
P3CB1AIV	20	I	23	I	29	S	23	S	33	S	10	R	13	R	20	S	40	S	25	S	28	S	29	S
P3CB1BI	..	R	..	R	15	I	11	R	32	S	21	S	17	S	19	S	40	S	18	S	28	S	33	S
P3CB1BII	..	R	..	R	15	I	10	R	30	S	22	S	17	S	19	S	38	S	18	S	25	S	31	S
P3CB1BIII	16	I	22	I	30	S	15	I	28	I	18	I	8	R	24	S	26	S	20	S	29	S	29	S
P3CB1BIV	..	R	11	R	12	R	25	S	24	I	20	S	24	S	25	S	33	S	21	S	24	S	21	I
P3CB1CI	..	R	8	R	10	R	23	S	21	I	18	I	22	S	24	S	28	S	20	S	22	S	24	I
P3CB1CII	..	R	..	R	18	I	23	S	31	S	24	S	14	R	27	S	38	S	22	S	37	S	40	S
P3CB1CIII	8	R	10	R	10	R	22	I	20	I	15	R	22	S	24	S	29	S	20	S	20	S	22	I
P3CB1CIV	..	R	13	R	12	R	26	S	28	I	21	S	26	S	24	S	36	S	23	S	26	S	25	I
P3CB2AI	..	R	8	R	13	R	22	I	23	I	19	I	23	S	26	S	30	S	22	S	21	S	24	I
P3CB2AII	..	R	8	R	..	R	28	S	23	I	24	S	26	S	23	S	43	S	20	S	28	S	30	S
P3CB2AIII	8	R	..	R	..	R	29	S	27	I	40	S	8	R	25	S	40	S	24	S	28	S	38	S
P3CB2AIV	12	R	15	I	..	R	15	I	33	S	16	R	12	R	18	S	41	S	24	S	30	S	36	S
P3CB2BI	14	R	10	R	25	I	26	S	42	S	28	S	8	R	24	S	54	S	28	S	40	S	44	S
P3CB2BII	..	R	..	R	..	R	8	R	33	S	24	S	17	S	18	S	38	S	20	S	26	S	29	S
P3CB2BIII	33	S	44	S	56	S	26	S	40	S	18	S	30	S	19	S	45	S	26	S	44	S	34	S
P3CB2BIV	..	R	8	R	..	R	18	I	34	S	23	S	19	S	19	S	34	S	18	S	20	S	33	S
P3CB2CI	..	R	..	R	..	R	21	I	33	S	22	S	16	I	21	S	49	S	23	S	33	S	39	S
P3CB2CII	27	I	35	S	33	S	15	I	40	S	11	R	12	S	20	S	40	S	19	S	23	S	35	S
P3CB2CIII	..	R	31	S	33	S	16	I	25	S	22	S	38	S
P3CB2CIV	..	R	..	R	23	I	20	I	23	I	22	S	..	R	18	S	34	S	16	S	34	S	43	S
P3CB3AI	..	R	9	R	10	R	..	R	24	I	17	I	8	R	18	S	39	S	18	S	23	S	30	S
P3CB3AII	..	R	..	R	..	R	14	I	32	S	18	I	14	R	17	S	54	S	21	S	33	S	31	S
P3CB3AIII	10	R	..	R	25	I	18	I	27	I	20	S	..	R	16	S	28	S	18	S	24	S	39	S
P3CB3AIV	..	R	..	R	..	R	12	R	31	S	20	S	16	I	33	S	36	S	17	S	22	S	33	S
P3CB3BI	26	I	30	S	32	S	25	S	30	S	20	S	24	S	20	S	31	S	18	S	33	S	38	S
P3CB3BII	..	R	12	R	18	I	10	R	42	S	24	S	15	I	40	S	23	S	22	S	26	S	37	S
P3CB3BIII	20	R	28	I	26	I	30	S	44	S	20	S	23	S	26	S	40	S	20	S	40	S	46	S
P3CB3BIV	..	R	15	I	8	R	..	R	13	I	16	R	..	R	22	S	22	S	20	S	38	S
P3CB3CI	..	R	10	R	12	R	..	R	21	I	12	R	9	R	17	S	27	S	18	S	13	R	11	R
P3CB3CII	30	S	35	S	40	S	26	S	32	S	18	I	..	R	22	S	30	S	19	S	25	S	35	S
P3CB3CIII	..	R	12	R	19	I	8	R	36	S	18	I	17	S	21	S	24	S	18	S	21	S	34	S
P3CB3CIV	20	I	24	I	29	I	16	I	35	S	..	R	24	S	26	S	44	S	22	S	36	S	39	S

Tabela 9 - Diâmetro dos halos de inibição formados para cada antimicrobiano testado (em mm) e sua caracterização em sensível (S), intermediária (I) e resistente (R). Cepas isoladas do ponto de coleta 4, P4CMF – Cachoeira Maria da Fé.

Amostra	Diâmetro dos halos de resistência (mm) (P4)																							
	PEN	AMO	AMP	ERI	CLO	RIF	VAN	EST	CIP	GEN	AZI	TET												
P4CMF1AI	..	R	..	R	21	I	24	S	28	I	22	S	14	R	24	S	47	S	22	S	32	S	39	S
P4CMF1AII	20	I	30	S	30	S	8	R	35	S	36	S	25	S	18	S	29	S	16	S	10	R	10	R
P4CMF1AIII	8	R	17	I	21	I	13	R	14	I	18	I	10	R	13	I	30	S	17	S	23	S	29	S
P4CMF1AIV	..	R	..	R	11	R	14	I	30	S	14	R	20	S	17	S	37	S	16	S	25	S	23	I
P4CMF1BI	9	R	23	I	30	S	10	R	32	S	22	S	17	S	27	S	30	S	15	S	25	S	30	S
P4CMF1BII	30	S	35	S	35	S	28	S	41	S	15	R	10	R	18	S	47	S	20	S	40	S	42	S
P4CMF1BIII																								
P4CMF1BIV	16	I	20	I	29	S	25	S	45	S	36	S	23	S	..	R	36	S	12	R	36	S	40	S
P4CMF1CI	25	I	..	R	..	R	32	S	38	S	18	I	15	I	30	S	46	S	19	S	48	S	42	S
P4CMF1CII	30	S	38	S	46	S	32	S	48	S	40	S	32	S	..	R	40	S	28	S	38	S	52	S
P4CMF1CIII	..	R	14	I	24	I	30	S	50	S	38	S	27	S	27	S	30	S	22	S	52	S	58	S
P4CMF1CIV																								
P4CMF2AI	15	I	19	I	24	I	33	S	46	S	40	S	22	S	28	S	32	S	25	S	32	S	44	S
P4CMF2AII	..	R	10	R	14	I	..	R	25	I	14	R	8	R	12	I	33	S	14	I	15	I	..	R
P4CMF2AIII	..	R	25	I	29	S	..	R	31	S	20	S	11	R	15	S	33	S	16	S	25	S	30	S
P4CMF2AIV	..	R	..	R	16	I	8	R	33	S	17	I	..	R	20	S	39	S	17	S	27	S	32	S
P4CMF2BI	..	R	..	R	..	R	16	I	30	S	11	R	..	R	9	R	43	S	17	S	34	S	40	S
P4CMF2BII	..	R	..	R	..	R	9	R	37	S	26	S	21	S	17	S	33	S	18	S	28	S	35	S
P4CMF2BIII	..	R	15	I	19	I	20	I	30	S	18	I	10	R	25	S	42	S	20	S	34	S	38	S
P4CMF2BIV	..	R	19	I	23	I	13	R	35	S	23	S	18	S	22	S	44	S	21	S	26	S	33	S
P4CMF2CI	..	R	8	R	14	I	8	R	32	S	18	I	14	R	21	S	44	S	19	S	24	S	32	S
P4CMF2CII	..	R	22	I	15	I	12	R	30	S	20	S	10	R	27	S	35	S	15	S	20	S	30	S
P4CMF2CIII	29	S	30	S	36	S	24	S	30	S	30	S	25	S	30	S	35	S	26	S	30	S	39	S
P4CMF2CIV	20	I	21	I	25	I	33	S	34	S	30	S	25	S	24	S	35	S	18	S	40	S	33	S
P4CMF3AI	..	R	9	R	17	I	..	R	33	S	17	I	..	R	20	S	36	S	17	S	19	S	33	S
P4CMF3AII	..	R	..	R	..	R	15	I	30	S	12	R	..	R	8	R	40	S	10	R	35	S	35	S
P4CMF3AIII	..	R	..	R	..	R	..	R	26	I	16	R	9	R	20	S	28	S	16	S	17	I	28	I
P4CMF3AIV	..	R	..	R	14	I	..	R	28	I	15	R	10	R	15	S	36	S	16	S	17	I	17	I
P4CMF3BI																								
P4CMF3BII									36	S	46	S	34	S	30	S	38	S			50	S		
P4CMF3BIII	..	R	22	I	26	I	10	R	26	I	17	I	12	R	15	S	30	S	14	I	25	S	..	R
P4CMF3BIV	..	R	10	R	21	I	11	R	29	S	20	S	10	R	22	S	45	S	18	S	27	S	33	S
P4CMF3CI	..	R	..	R	..	R	15	I	22	I	19	I	..	R	32	S	50	S	30	S	35	S	30	S
P4CMF3CII	..	R	27	I	25	I	15	I	19	I	20	S	14	R	..	R	47	S	21	S	38	S	38	S
P4CMF3CIII	..	R	..	R	14	I	16	I	24	S	25	S	18	S	10	R	40	S	17	S	28	S	32	S
P4CMF3CIV	..	R	25	I	22	I	12	R	19	I	18	I	16	I	8	R	44	S	20	S	28	S	14	I

Tabela 10 - Diâmetro dos halos de inibição formados para cada antimicrobiano testado (em mm) e sua caracterização em sensível (S), intermediária (I) e resistente (R). Cepas isoladas do ponto de coleta 5, P5RWB - Rio Wenceslau Braz.

Amostra	Diâmetro dos halos de resistência (mm) (P5)																							
	PEN	AMO	AMP	ERI	CLO	RIF	VAN	EST	CIP	GEN	AZI	TET												
P5RWB1AI	..	R	..	R	13	R	22	I	25	I	22	S	12	R	21	S	50	S	22	S	33	S	32	S
P5RWB1AII	..	R	10	R	18	I	25	S	21	I	17	I	16	I	24	S	48	S	21	S	32	S	40	S
P5RWB1AIII	32	S	28	I	33	S	24	S	23	I	26	S	24	S	21	S	31	S	20	S	24	S	33	S
P5RWB1AIV	..	R	..	R	10	R	8	R	19	I	20	S	10	R	17	S	27	S	15	S	24	S	26	I
P5RWB1BI	..	R	11	R	22	I	9	R	34	S	19	I	12	R	23	S	44	S	19	S	28	S	33	S
P5RWB1BII	..	R	..	R	..	R	..	R	28	I	20	S	17	S	15	S	22	S	17	S	16	I	11	R
P5RWB1BIII	..	R	..	R	..	R	..	R	25	I	19	I	14	R	15	S	23	S	15	S	13	R	12	I
P5RWB1BIV	20	I	16	I	40	S	15	I	60	S	
P5RWB1CI	30	S	29	S	35	S	25	S	28	I	20	S	26	S	21	S	32	S	19	S	22	S	33	S
P5RWB1CII	..	R	15	I	17	I	12	R	18	I	20	S	15	I	15	S	23	S	15	S	21	S	28	I
P5RWB1CIII	24	I	25	I	30	S	21	I	27	I	20	S	24	S	20	S	28	S	19	S	15	I	30	S
P5RWB1CIV	30	S	30	R	33	S	24	S	30	S	22	S	27	S	18	S	32	S	20	S	23	S	32	S
P5RWB2AI	14	R	32	R	30	S	26	S	30	S	26	S	20	S	22	S	40	S	16	S	28	S	33	S
P5RWB2AII	..	R	22	I	24	I	10	R	24	I	24	S	20	S	23	S	35	S	19	S	33	S	23	I
P5RWB2AIII	..	R	19	I	40	S	12	R	25	I	30	S	23	S	23	S	20	I	24	S	20	S	33	S
P5RWB2AIV	10	R	20	I	20	I	..	R	25	I	28	S	15	I	19	S	24	S	22	S	22	S	26	I
P5RWB2BI	..	R	..	R	9	R	10	R	28	I	20	S	17	S	18	S	33	S	18	S	22	S	30	S
P5RWB2BII	..	R	..	R	13	R	..	R	21	I	18	S	10	R	19	S	35	S	17	S	23	S	28	I
P5RWB2BIII	10	R	25	I	40	S	15	I	35	S	30	S	20	S	25	S	40	S	22	S	40	S	34	S
P5RWB2BIV	..	R	..	R	10	R	10	R	33	S	21	S	17	S	20	S	41	S	16	S	18	S	32	S
P5RWB2CI	..	R	..	R	13	R	15	I	14	I	24	S	13	R	20	S	32	S	18	S	20	S	29	S
P5RWB2CII	..	R	..	R	13	R	10	R	34	S	23	S	18	S	17	S	40	S	20	S	24	S	32	S
P5RWB2CIII	..	R	10	R	18	I	22	I	25	I	26	S	12	R	26	S	54	S	25	S	36	S	37	S
P5RWB2CIV	..	R	10	R	20	I	24	S	28	I	25	S	24	S	20	S	33	S	20	S	23	S	27	I
P5RWB3AI	..	R	10	R	10	R	10	R	30	S	21	S	15	I	18	S	35	S	16	S	24	S	29	S
P5RWB3AII	..	R	20	I	50	S	14	I	25	I	28	S	15	I	29	S	38	S	30	S	20	S	38	S
P5RWB3AIII	..	R	..	R	..	R	15	I	22	I	18	I	..	R	25	S	44	S	24	S	33	S	33	S
P5RWB3BI	..	R	..	R	10	R	10	R	31	S	15	R	17	S	13	I	34	S	15	S	19	S	30	S
P5RWB3BII	..	R	..	R	10	R	12	R	26	I	19	I	11	R	21	S	50	S	20	S	32	S	33	S
P5RWB3BIII	..	R	..	R	13	R	17	I	34	S	24	S	18	S	20	S	32	S	19	S	15	I	33	S
P5RWB3BIV	..	R	13	R	16	I	30	S	46	S	32	S	21	S	17	S	50	S	22	S	48	S	44	S
P5RWB3CI	10	R	25	I	30	S	18	I	41	S	30	S	24	S	21	S	40	S	26	S	40	S	36	S
P5RWB3CII	..	R	..	R	..	R	10	R	33	S	20	S	14	R	21	S	29	S	20	S	26	S	33	S
P5RWB3CIII	..	R	16	I	20	I	10	R	35	S	24	S	12	R	25	S	39	S	22	S	25	S	34	S
P5RWB3CIV	..	R	..	R	20	I	18	I	33	S	28	S	13	R	24	S	62	S	23	S	38	S	39	S

Com base nos resultados obtidos e apresentados nas tabelas de 6 a 10, foi possível observar o grau de eficiência dos antimicrobianos testados nos isolados selecionados. Esses dados estão apresentados na figura 17.

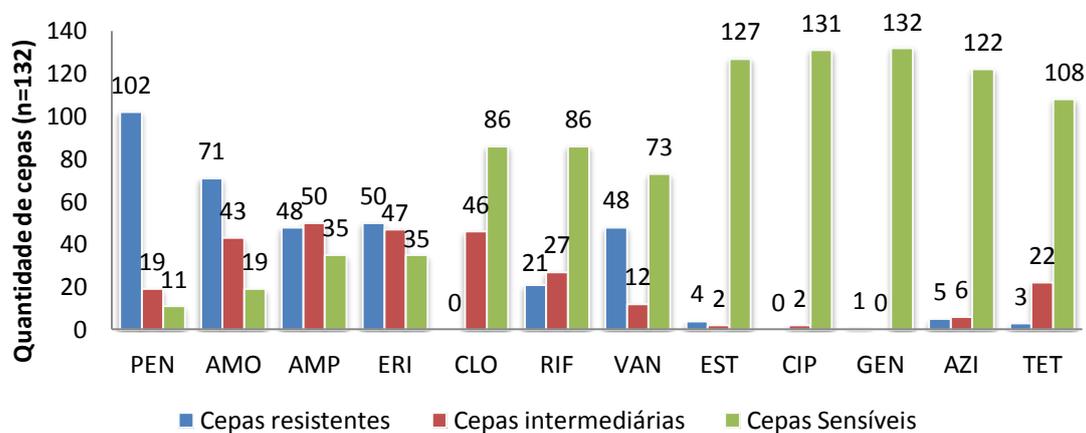


Figura 17 - Comparativo de eficiência entre os antimicrobianos analisados através quantidade de cepas resistentes, intermediárias ou sensíveis a cada um dos mesmos (n=132).

No presente estudo, o antimicrobiano menos eficiente foi a penicilina com 102 isolados resistentes (77,3%), seguido da amoxicilina (53,8%), eritromicina (37,8%), ampicilina (36,4%) e vancomicina (36,4%), conforme figura 17. Segundo Gangle (2005), com o uso excessivo da penicilina, desde sua descoberta em 1928, houve um aumento nos padrões de resistência, o que pode ser exemplificado pelo aumento de menos de 1% de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* em meados de 1930 para 90% das cepas isoladas em hospitais, em 2005. Em 1950 a maioria das cepas isoladas nos hospitais de todo o mundo já havia sido resistente à penicilina. Esse mesmo autor comentou que esse alto índice de resistência à penicilina, ampicilina e amoxicilina é preocupante devido à uma alta diversidade de microrganismos patogênicos serem resistentes a tais drogas, tais como *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Salmonella spp.*, *Vibrio spp.* e *Escherichia coli*, todas envolvidas em doenças relacionadas ao trato gastrointestinal.

Segundo Brasil (2010) a penicilina, assim como seus derivados, ampicilina e amoxicilina, são antimicrobianos pertencentes ao grupo do β -lactâmicos, bactericidas que possuem como mecanismo de ação a interferência na síntese da parede celular bacteriana. Um fator preocupante encontrado no presente estudo, nos diferentes pontos de coleta, foi além da observação de alto índice de resistência aos antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos, a observação de isolados resistentes também à eritromicina (tabelas 6 a 10), pertencente ao grupo dos macrolídeos que, diferentemente dos β -lactâmicos, possui amplo

espectro de ação, atuando na síntese de proteína, podendo ser bactericida ou bacteriostático, dependendo das concentrações indicadas (BRASIL, 2010). Essa relação entre as duas classes de antimicrobianos pode ser dada pelo uso alternativo da eritromicina em pacientes alérgicos à penicilina, sendo ambos utilizados para o mesmo tipo de infecções (BRASIL, 2010).

Outra observação a ser feita é o comportamento de resistência/sensibilidade aos antimicrobianos rifampicina (21 isolados resistentes e 86 isolados sensíveis) e vancomicina (com 48 isolados resistentes e 73 sensíveis). A vancomicina é um antimicrobiano do grupo dos Glicopeptídeos, possui atividade contra microrganismos gram-positivos, ação bactericida, atuando na inibição da biossíntese da parede celular, alterando a permeabilidade da membrana e a síntese de RNA microbiano (ANVISA, 2008a, BRASIL, 2010). Como só possui como forma de apresentação infusão intravenosa, seu uso é restrito a hospitais no tratamento de infecções consideradas sérias (ANVISA, 2008a). A rifampicina, por sua vez, é um antimicrobiano macrocíclico complexo, bactericida, que inibe a síntese de RNA, de uso restrito a tratamentos de tuberculose e hanseníase (ANVISA, 2008b). A observação de isolados resistentes a tais antimicrobianos não era esperado, uma vez que, segundo a ANVISA (2008a), não há resistência cruzada entre vancomicina e outras classes de antimicrobianos, e, mesmo sendo de uso restrito e/ou controlado, apresentaram uma grande quantidade de cepas resistentes.

De acordo a figura 17, os antimicrobianos que apresentaram maior eficiência entre os isolados analisados foram a azitromicina (92,4% dos isolados sensíveis), gentamicina (100%), estreptomicina (96,2%), ciprofloxacino (99,2%), tetraciclina (81,8%) e cloranfenicol (65,2%). Tais antimicrobianos são pertencentes às classes dos macrolídeos (azitromicina), aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacino), tetraciclina (tetraciclina) e anfenicóis (cloranfenicol).

Segundo Brasil (2010) a azitromicina apresenta resistência cruzada com a eritromicina, por serem da mesma classe. No presente trabalho foi possível observar que todos os isolados resistentes à azitromicina também foram resistentes à eritromicina (tabelas de 9 a 13). Ainda segundo Brasil (2010) os antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos são usados principalmente em pacientes com infecções graves, devido ao seu efeito tóxico. São bactericidas com raro desenvolvimento de resistência, o que explica a pequena quantidade de isolados resistentes tanto à gentamicina (1) quanto à estreptomicina (4). Os demais grupos possuem indicação de uso restrita, ou por terem ação tóxica ou para se evitar a disseminação de resistência (BRASIL, 2010).

Os resultados obtidos estão de acordo com os dados observados por Vignesh, Muthukumar e James (2012) em seu estudo com microrganismos isolados de diferentes ambientes costeiros de recreação, onde as maiores resistências foram observadas nos grupos dos glicopeptídeos (VAN); β -lactâmicos (PEN, AMO, AMP) e macrolídeos (ERI), enquanto as menores taxas de resistência foram encontradas nos grupos da tetraciclina (TET), aminoglicosídeos (GEN), quinolonas (CIP) e anfenicol (CLO).

No estudo realizado por Halling-Sorensen (1998), foi observado que a resistência à eritromicina, cloranfenicol e tetraciclina foi limitada a locais poluídos por esgoto doméstico. No presente estudo, não foi encontrado isolado resistente a cloranfenicol em nenhum dos pontos amostrados. No entanto, foi encontrado um isolado resistente à tetraciclina na cachoeira de Brazópolis (P3 – tabela 11), na cachoeira de Maria da Fé (P4 – tabela 12) e no Rio de Wenceslau Braz (P5 – tabela 13). Todos os pontos apresentaram vários isolados resistentes à eritromicina.

No presente estudo, foram consideradas cepas multirresistentes as que apresentaram resistência a dois antimicrobianos ou mais antimicrobianos, conforme proposto por Lobova *et al.* (2008). Tais microrganismos apresentam grande importância na saúde pública por tornar cada vez mais difícil o tratamento de doenças infecciosas. A proporção de isolados do Grupo I, multirresistentes em comparação aos isolados sensíveis e resistentes (quando o isolado só apresentou resistência a um antimicrobiano) está apresentada na figura 18.

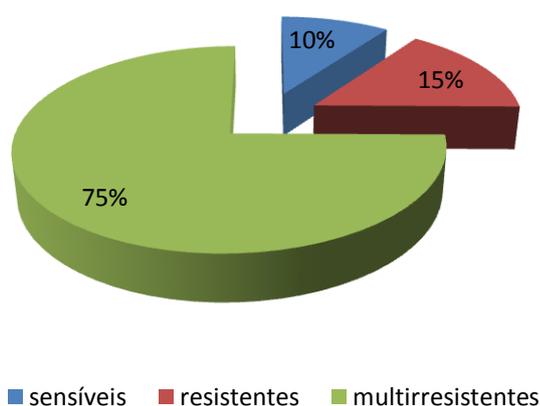


Figura 18 - Ocorrência de cepas multirresistentes no grupo I (bactérias heterotróficas n=132).

É possível observar que 75% das cepas selecionadas foram resistentes a pelo menos dois antimicrobianos, enquanto que somente 10% foram sensíveis a todos os

antimicrobianos testados. Esse resultado é semelhante aos dados observados por Zanatta *et al.* (2004) que, embora sejam cepas de *E. coli* de origem aviária, apresentaram 77,5% de cepas multirresistentes e apenas 5,8% de cepas sensíveis. O resultado obtido para as áreas de recreação de água doce foram mais críticos do que os 30% encontrados por Mudryk (2005) no estudo semelhante desenvolvido em águas de recreação marinha.

Os altos índices de bactérias multirresistentes encontradas podem ser explicados pelo período em que foram realizadas as coletas, entre os meses de fevereiro e março. Segundo Lobova *et al.* (2002), durante os meses de verão há um aumento na observação de cepas multirresistentes no ambiente, devido ao aumento do aporte alóctone, tanto pelo aumento na frequência de turistas, quanto pela maior quantidade de chuvas.

Essa alta concentração de bactérias multirresistentes observadas é alarmante, uma vez que, em contato com o organismo, tais cepas, mesmo não sendo patógenos potenciais ou oportunistas, podem ter condições de se estabelecer no organismo e, dessa forma, ter a chance de transferir os genes de resistência à microflora comensal ou aos futuros patógenos causadores de infecção (SOMMER; DANTAS, 2011).

Outro aspecto preocupante é a capacidade de bioacumulação e contaminação ambiental, conforme apresentado em estudo recente de Barkovskii *et al.* (2012), que analisaram a presença de genes de resistência à tetraciclina em ostras estuarinas, mesmo na ausência dos mesmos na coluna d'água. Segundo os autores, a capacidade das ostras de bioacumular algumas espécies de microrganismos (como *Pseudomonas sp* e *Aeromonas sp.*) pode ser revertida dependendo das alterações de temperatura e salinidade, podendo ser considerada como sumidouro ou fonte de disponibilidade de genes de resistência em ambientes estuarinos.

5.3 Caracterização fenotípica

As colônias selecionadas para a realização do teste de resistência a antimicrobianos foram caracterizadas, no momento da seleção, quanto ao seu fenótipo e os resultados encontram-se nas tabelas de 11 a 15.

Tabela 11 - Caracterização fenotípica das colônias selecionadas aleatoriamente para o teste de resistência aos antimicrobianos selecionados (cepas isoladas do ponto de coleta 1 (P1R1), Rio Sapucaí, Itajubá).

Caracterização Fenotípica das colônias selecionadas do Rio de Itajubá (P1)						
amostra	diâmetro (mm)	forma	Produção de goma	Bordas	cor	elevação
RI1HAI	3	circular	sim / brilho	inteira	branco/amarelado	convexa
RI1HAII	3	circular	sim / brilho	inteira	branco/amarelado	convexa
RI1HAIII	5	circular	sim / brilho	erosado	branco/amarelado	convexa
RI1HAIV	7	circular	sim / brilho	inteira	branco/amarelado	convexa
RI1HBI	2	circular	não / fosco	filamentoso	rosa	convexa
RI1HBII	2	circular	não / fosco	filamentoso	salmão	convexa alta
RI1HBIII	3	circular	não / fosco	inteira	branca	convexa
RI1HBIV	2	circular	sim / brilho	inteira	amarela	convexa
RI1HCI	3	circular	sim / opaca	inteira	branco/amarelado	convexa
RI1HCII	4	circular	sim / brilho	ondulado	branco/amarelado	convexa
RI1HCIII	5	circular	sim / opaca	filamentoso	branco/amarelado	convexa
RI1HCIV	2	circular	não / fosco	inteira	branco/amarelado	elevada
RI2HAI	2	circular	não / fosco	inteira	rosa	convexa
RI2HAII	2	circular	sim / opaca	inteira	laranja	convexa
RI2HAIII	3	circular	sim / brilho	erosado	amarela	convexa
RI2HAIV	2	circular	sim / brilho	filamentoso	salmão	convexa
RI2HBI	3	circular	sim / brilho	inteira	amarelo gema	convexa
RI2HBII	4	circular	sim / brilho	ondulado	amarelo limão	convexa
RI2HBIII	4	circular	sim / brilho	ondulado	amarela	convexa
RI2HBIV	4	circular	sim / brilho	inteira	branca	convexa
RI2HCI	4	circular	sim / brilho	lobado	amarela	ondulada
RI2HCII	1	circular	não / fosco	inteira	branca	convexa
RI2HCIII	1	circular	não / fosco	inteira	branca	convexa
RI2HCIV	1	circular	sim / brilho	inteira	branca	convexa
RI3HAI	2	circular	sim / opaca	ondulado	rosa	convexa
RI3HAII	3	circular	sim / brilho	inteira	amarelo	convexa
RI3HAIII	4	circular	sim / brilho	inteira	branca	convexa
RI3HAIV	4	circular	sim / brilho	ondulado	branca	convexa
RI3HBI	3	circular	não / brilho	lobado	branca - transparente	ondulada
RI3HBII	5	circular	sim / brilho	inteira	branca	convexa
RI3HBIII	3	circular	sim / brilho	ondulado	amarela - transparente	convexa
RI3HBIV	2	circular	sim / fosco	inteira	branca	convexa
RI3HCI	7	circular	sim / brilho	filamentoso	amarela	ondulada
RI3HCII	5	circular	sim / brilho	inteira	amarela	convexa
RI3HCIII	2	circular	sim / brilho	inteira	amarela	convexa
RI3HCIV	3	circular	sim / brilho	inteira	branca	convexa

Tabela 12 - Caracterização fenotípica das colônias selecionadas aleatoriamente para o teste de resistência aos antimicrobianos selecionados. Cepas isoladas do ponto de coleta 2 (P2CG), Cachoeira, Gonçalves.

Caracterização Fenotípica das colônias selecionadas da Cachoeira de Gonçalves (P2).						
amostra	diâmetro (mm)	forma	Produção de goma	Bordas	cor	elevação
P2CG1AI	6	circular	não	inteiro	amarela/laranja	convexa
P2CG1AII	1,5	circular	não	inteiro	amarela	convexa
P2CG1AIII	1,5	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG1AIV	8	circular	não	ondulado	branca	convexa
P2CG1BI	2,5	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG1BII	1,5	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG1BIII	3	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG1BIV	4	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG1CI	8	circular	sim	inteiro	branca	convexa alta
P2CG1CII	4	circular	não	inteiro	amarela	convexa
P2CG1CIII	4	circular	não	inteiro	branca/transparente	convexa
P2CG1CIV	1,5	circular	não	inteiro	branca/transparente	convexa
P2CG2AI	3,5	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG2AII	6	circular	não	inteiro	branca/amarela	convexa
P2CG2AIII	2	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG2AIV	3	circular	não	inteiro	branca/transparente	convexa
P2CG2BI	4	circular	não	inteiro	branca/transparente	ondulada
P2CG2BII	1	puntiforme	não	inteiro	branca	convexa
P2CG2BIII	0,5	puntiforme	não	inteiro	transparente	convexa
P2CG2BIV	9	circular	não	ondulado	branca	convexa
P2CG2CI	2	circular	sim	inteiro	roxa	convexa
P2CG2CII	3	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG2CIII	6	circular	não	ondulado	branca	convexa
P2CG2CIV	2	circular	não	inteiro	branca/transparente/azul	convexa
P2CG3AI	9,5	circular	não	ondulado	branca	convexa
P2CG3AII	2,5	circular	não	inteiro	branca/transparente	convexa
P2CG3AIII	1	puntiforme	não	inteiro	branca	ondulada
P2CG3AIV	1	puntiforme	não	inteiro	branca	convexa
P2CG3BI	2,5	circular	não	inteiro	amarela	convexa
P2CG3BII	4,5	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG3BIII	2	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG3BIV	1,5	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG3CI	4,5	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG3CII	2,5	circular	não	ondulado	branca	convexa
P2CG3CIII	5	circular	não	inteiro	branca	convexa
P2CG3CIV	2	circular	não	inteiro	branca	elevada

Tabela 13 - Caracterização fenotípica das colônias selecionadas aleatoriamente para o teste de resistência aos antimicrobianos selecionados. Cepas isoladas do ponto de coleta 3 (P3CB), Cachoeira, Brazópolis.

Caracterização Fenotípica das colônias selecionadas da Cachoeira de Brazópolis (P3).						
amostra	diâmetro (mm)	forma	Produção de goma	Bordas	cor	elevação
P3CB1AI	2	circular	não	inteira	roxa	convexa alta
P3CB1AII	1	puntiforme	não	inteira	branca	convexa
P3CB1AIII	2	circular	não	inteira	amarela	convexa
P3CB1AIV	1	puntiforme	não	inteira	branca	convexa
P3CB1BI	1,5	circular	sim	inteira	branca	convexa
P3CB1BII	4	circular	não	inteira	branca	convexa
P3CB1BIII	1,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P3CB1BIV	2	circular	não	inteira	amarela	convexa
P3CB1CI	6	irregular	sim	ondulado	branca	convexa
P3CB1CII	1	puntiforme	não	inteira	roxa	convexa alta
P3CB1CIII	1,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P3CB1CIV	2	circular	não	inteira	amarela	convexa
P3CB2AI	5	irregular	não	ondulado	branca	convexa
P3CB2AII	1,5	circular	sim	Inteira	branca	convexa
P3CB2AIII	3	circular	não	inteira	amarela	convexa
P3CB2AIV	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P3CB2BI	2	circular	não	inteira	roxa	convexa alta
P3CB2BII	4	circular	não	ondulado	branca	convexa
P3CB2BIII	1,5	circular	sim	inteira	branca	convexa
P3CB2BIV	4	circular	não	inteira	amarela	convexa
P3CB2CI	3,5	circular	não	inteira	roxa	convexa alta
P3CB2CII	4	circular	não	inteira	branca	convexa
P3CB2CIII	1,5	circular	sim	inteira	branca	convexa
P3CB2CIV	1	puntiforme	não	inteira	branca	convexa
P3CB3AI	4	irregular	não	ondulado	transparente	convexa
P3CB3AII	2,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P3CB3AIII	1	puntiforme	não	inteira	amarela	convexa
P3CB3AIV	5,5	circular	não	inteira	amarela	convexa
P3CB3BI	3	circular	não	inteira	branca	convexa
P3CB3BII	2	circular	sim	inteira	amarela	convexa
P3CB3BIII	3	circular	não	inteira	transparente	convexa
P3CB3BIV	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P3CB3CI	4	circular	não	inteira	rosa/branca	convexa alta
P3CB3CII	2	circular	não	inteira	amarela gema	convexa
P3CB3CIII	2,5	circular	não	inteira	transparente	convexa
P3CB3CIV	1,5	circular	não	inteira	branca	convexa

Tabela 14 - Caracterização fenotípica das colônias selecionadas aleatoriamente para o teste de resistência aos antimicrobianos selecionados. Cepas isoladas do ponto de coleta 4 (P4CMF), Cachoeira, Maria da Fé.

Caracterização Fenotípica das colônias selecionadas da Cachoeira de Maria da Fé (P4).						
amostra	diâmetro (mm)	forma	Produção de goma	Bordas	cor	elevação
P4CMF1AI	1,5	circular	não	inteira	roxa	convexa alta
P4CMF1AII	1	puntiforme	não	inteira	branca	convexa
P4CMF1AIII	1,5	circular	não	inteira	branca transparente	convexa
P4CMF1AIV	4,5	circular	não	inteira	amarela	convexa
P4CMF1BI	2	circular	não	inteira	branca transparente	convexa
P4CMF1BII	2,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF1BIII	0,5	puntiforme	não	inteira	branca	convexa
P4CMF1BIV	1	puntiforme	não	inteira	branca	convexa
P4CMF1CI	2	circular	não	ondulado	branca	convexa
P4CMF1CII	1	puntiforme	não	inteira	amarela	convexa alta
P4CMF1CIII	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF1CIV	1	puntiforme	não	inteira	branca	convexa
P4CMF2AI	1	puntiforme	não	inteira	roxa	convexa
P4CMF2AII	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF2AIII	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF2AIV	0,5	puntiforme	não	inteira	branca	convexa
P4CMF2BI	2	circular	não	inteira	branca	convexa alta
P4CMF2BII	2,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF2BIII	1	puntiforme	não	inteira	amarela claro	convexa
P4CMF2BIV	1	puntiforme	não	inteira	branca transparente	convexa
P4CMF2CI	1,5	circular	sim	inteira	roxa	convexa alta
P4CMF2CII	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF2CIII	1,5	irregular	não	ondulado	branca	convexa
P4CMF2CIV	2,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF3AI	2	circular	não	inteira	roxa	convexa
P4CMF3AII	1,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF3AIII	1,5	circular	não	inteira	branca transparente	convexa
P4CMF3AIV	1,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF3BI	1	puntiforme	não	inteira	branca	convexa
P4CMF3BII	1	puntiforme	não	inteira	amarela transparente	convexa
P4CMF3BIII	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF3BIV	3,5	circular	sim	ondulado	branca	convexa
P4CMF3CI	0,5	puntiforme	sim	inteira	branca	convexa alta
P4CMF3CII	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P4CMF3CIII	4	circular	não	inteira	amarela transparente	convexa
P4CMF3CIV	1	circular	sim	inteira	amarela transparente	convexa

Tabela 15 - Caracterização fenotípica das colônias selecionadas aleatoriamente para o teste de resistência aos antimicrobianos selecionados. Cepas isoladas do ponto de coleta 5 (P5RWB), Rio, Wenceslau Braz.

Caracterização Fenotípica das colônias selecionadas do Rio de Wnceslau Braz (P5).						
amostra	diâmetro (mm)	forma	Produção de goma	Bordas	cor	elevação
P5RWB1AI	2	circular	não	inteira	roxa	convexa alta
P5RWB1AII	1,5	circular	sim	inteira	roxa	convexa
P5RWB1AIII	3	circular	sim	ondulado	branca	convexa
P5RWB1AIV	2,5	circular	não	inteira	amarela	convexa
P5RWB1BI	1,5	circular	não	inteira	amarela transparente	convexa
P5RWB1BII	4,5	circular	não	ondulado	branca	convexa
P5RWB1BIII	1,5	circular	não	inteira	amarela	convexa
P5RWB1BIV	2	circular	sim	inteira	branca	convexa
P5RWB1CI	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P5RWB1CII	2	circular	não	inteira	branca	convexa alta
P5RWB1CIII	4	irregular	sim	ondulado	branca	convexa
P5RWB1CIV	2	circular	não	inteira	roxa	convexa
P5RWB2AI	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P5RWB2AII	1,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P5RWB2AIII	2	circular	não	inteira	amarela	convexa
P5RWB2AIV	1,5	circular	não	inteira	amarela	convexa
P5RWB2BI	5	circular	não	ondulado	branca	convexa alta
P5RWB2BII	2,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P5RWB2BIII	2	circular	não	inteira	amarela	convexa
P5RWB2BIV	3	circular	não	inteira	branca	convexa
P5RWB2CI	2	circular	não	inteira	branca	convexa alta
P5RWB2CII	5	circular	não	inteira	amarela	convexa
P5RWB2CIII	1,5	circular	não	inteira	roxa	convexa
P5RWB2CIV	1,5	circular	não	inteira	amarela	convexa
P5RWB3AI	6	circular	não	ondulado	amarela	convexa
P5RWB3AII	1,5	irregular	não	ondulado	amarela	convexa
P5RWB3AIII	1	puntiforme	não	inteira	branca	convexa
P5RWB3AIV	1,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P5RWB3BI	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P5RWB3BII	1	puntiforme	não	inteira	amarela	convexa
P5RWB3BIII	5	circular	não	inteira	branca	convexa
P5RWB3BIV	1,5	circular	não	inteira	branca	convexa
P5RWB3CI	1	puntiforme	não	inteira	amarela	convexa alta
P5RWB3CII	2	circular	não	inteira	branca	convexa
P5RWB3CIII	1,5	circular	não	inteira	amarela	convexa
P5RWB3CIV	2	circular	não	inteira	roxa	convexa

As 36 colônias selecionadas aleatoriamente de cada ponto de coleta foram submetidas à análise de agrupamento de semelhança para avaliação da diversidade fenotípica-cultural, cujos resultados encontram-se no subitem a seguir.

5.3.1 Caracterização Ponto a Ponto

À exceção do ponto 1, onde a 60% de similaridade, sete grandes grupos foram formados (figura 19), em todos os demais pontos, foram formados seis grandes grupos fenotípico-culturais (figuras 20, 21, 23 e 24). Tal resultado indica que as colônias de bactérias heterotróficas selecionadas para o estudo de resistência a antimicrobianos apresentaram variabilidade fenotípica suficientemente provável de não pertencerem às mesmas espécies, possibilitando a identificação de grupos representativos de comunidades bacterianas nos diferentes pontos de coleta.

Na análise dos isolados obtidos a partir das amostras de água do Rio Sapucaí, Itajubá (P1) pode ser observado, a 60% de similaridade, a formação de 7 grandes grupos. O grande grupo 5 foi considerado o grupo representativo do local amostrado - com 12 isolados (33,3%) - por ser o que possui maior número de isolados (Figura 19).

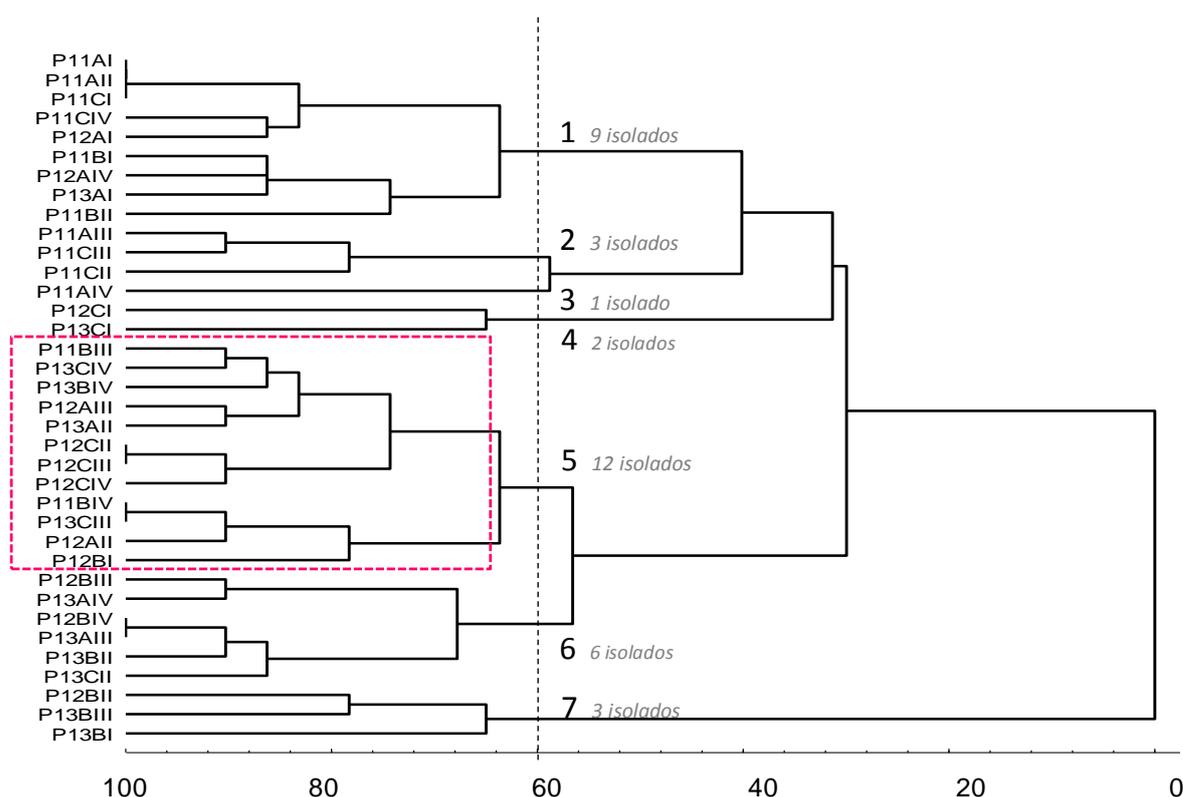


Figura 19 - Dendrograma de similaridade entre as trinta e seis colônias selecionadas no ponto 1 (P1, Rio Sapucaí, Itajubá), construído por meio de suas características fenotípico-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 60% de similaridade.

A figura 20 mostra que para o ponto de coleta 2 (Cachoeira do Simão, Gonçalves), diferentemente do ponto de coleta 1 que houve a formação de 7 grandes grupos, pode ser observado, a 60% de similaridade, a formação de 6 grandes grupos. Os demais pontos seguiram o mesmo comportamento, apresentando a formação de 6 grandes grupos. O grande

grupo 3 foi considerado o grupo representativo do local amostrado, com 15 isolados (41,6%).

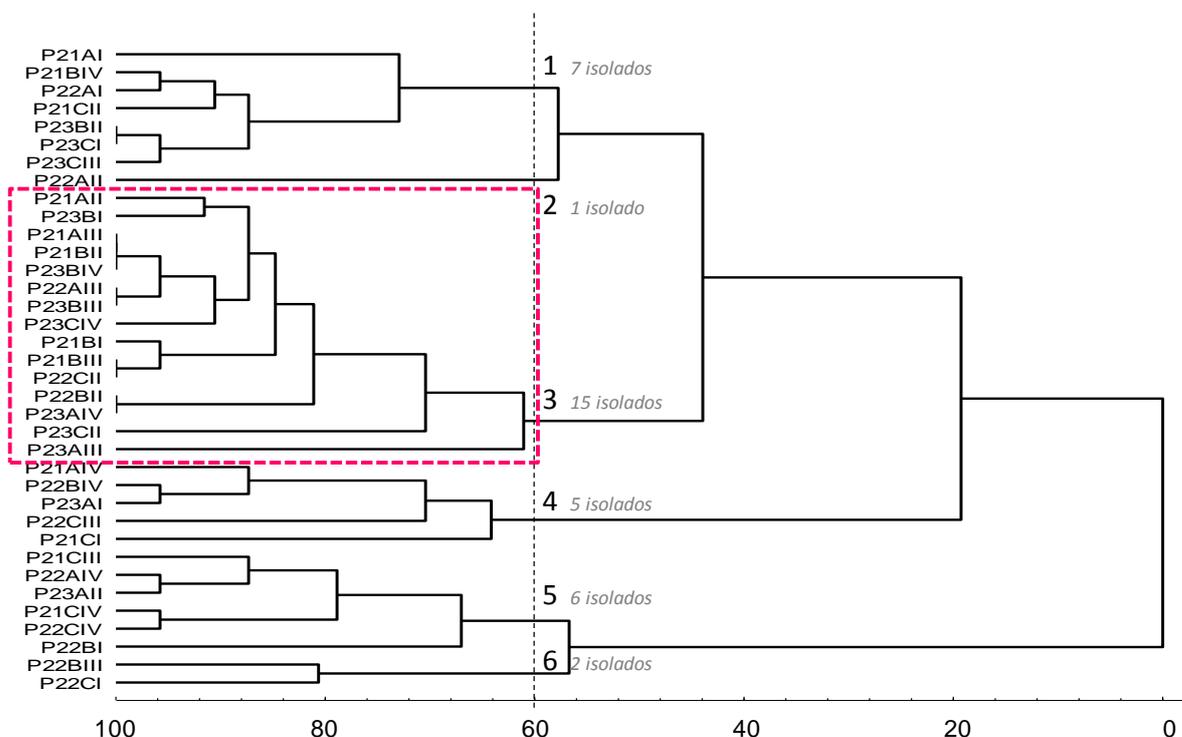


Figura 20 - Dendrograma de similaridade entre as trinta e seis colônias selecionadas no ponto 2 (P2, Cachoeira, Gonçalves), construído por meio de suas características fenotípicas-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 60% de similaridade.

As figuras 21, 22 e 23 apresentam os resultados obtidos na análise de agrupamento dos isolados selecionados, respectivamente, na Cachoeira do Alegre, Brazópolis (P3), Cachoeira de Maria da Fé (P4) e no Rio Bica, Wenceslau Braz (P5).

Analisando os resultados obtidos, pode ser observado que o grande grupo representativo dos demais pontos de coleta é o 4, com, 20 isolados (55,5%) nos pontos de coleta P3 (figura 21) e P4 (figura 22) e 22 isolados no ponto de coleta P5 (61,1% - figura 23).

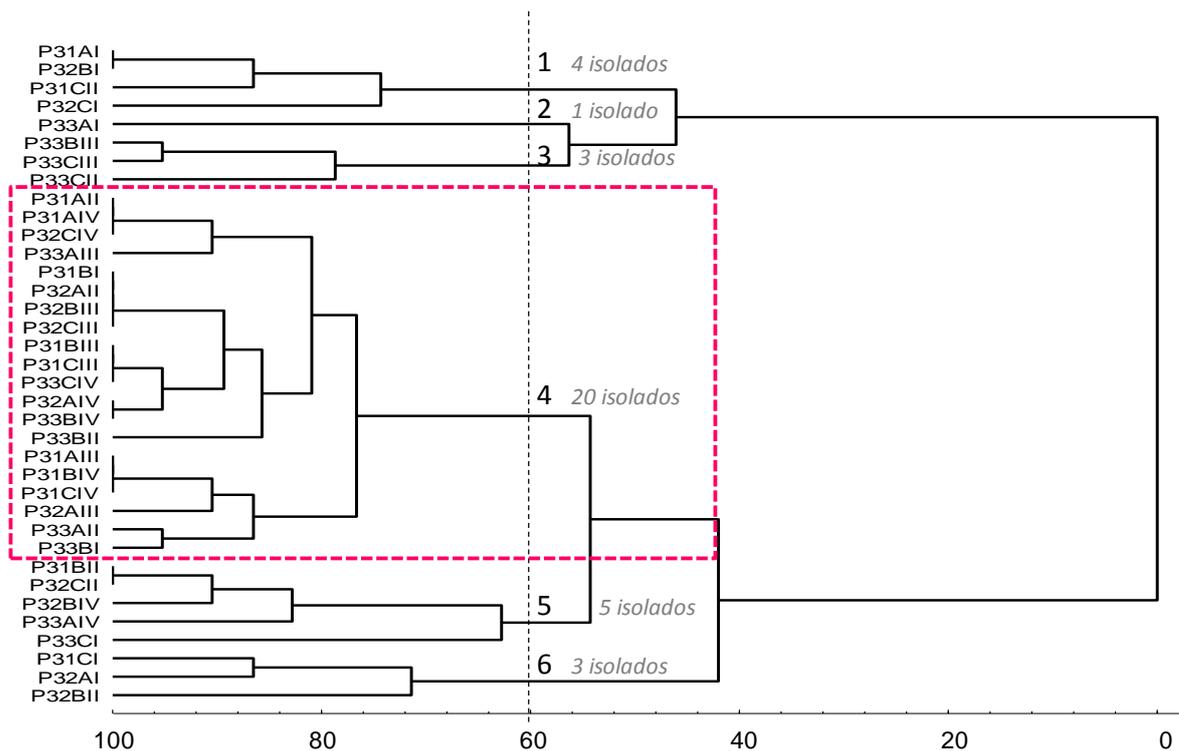
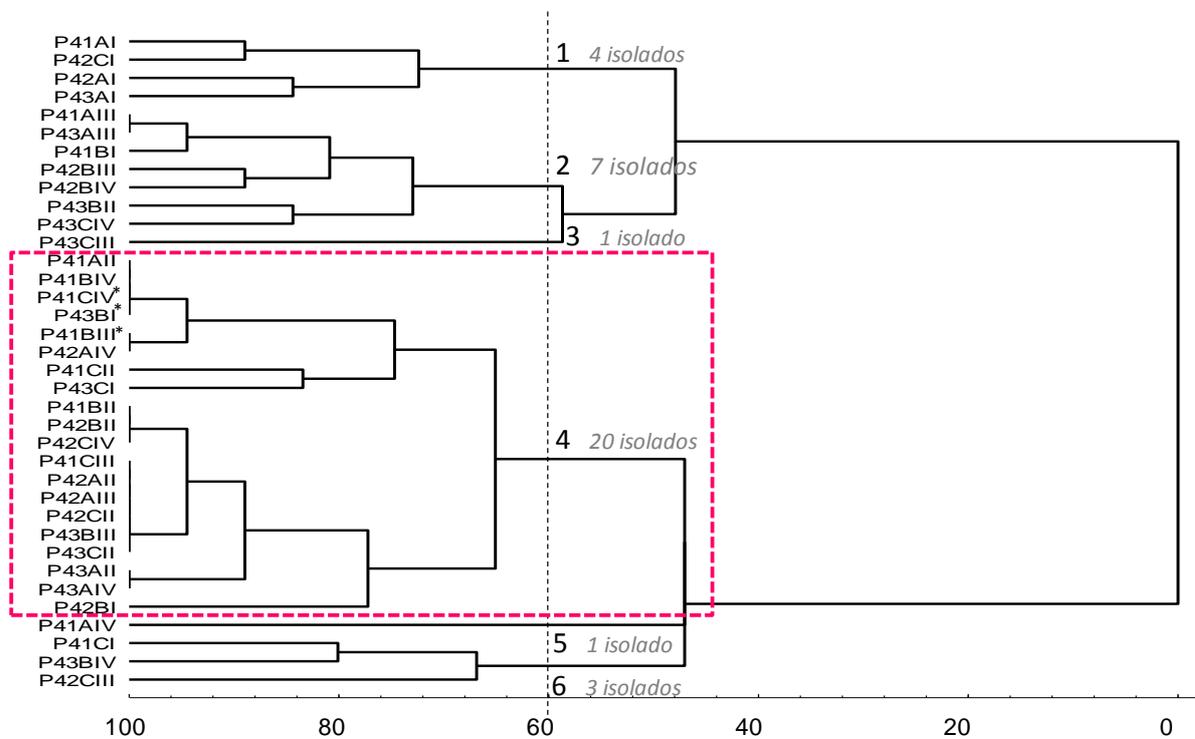


Figura 21 - Dendrograma de similaridade entre as trinta e seis colônias selecionadas no ponto 3 (P3, Cachoeira, Brazópolis), construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 60% de similaridade.



* impossibilidade da realização do teste de resistência aos antimicrobianos.

Figura 22 - Dendrograma de similaridade entre as trinta e seis colônias selecionadas no ponto 4 (P4, Cachoeira, Maria da Fé), construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 60% de similaridade. * Impossibilidade de realização do teste de resistência a antimicrobianos.

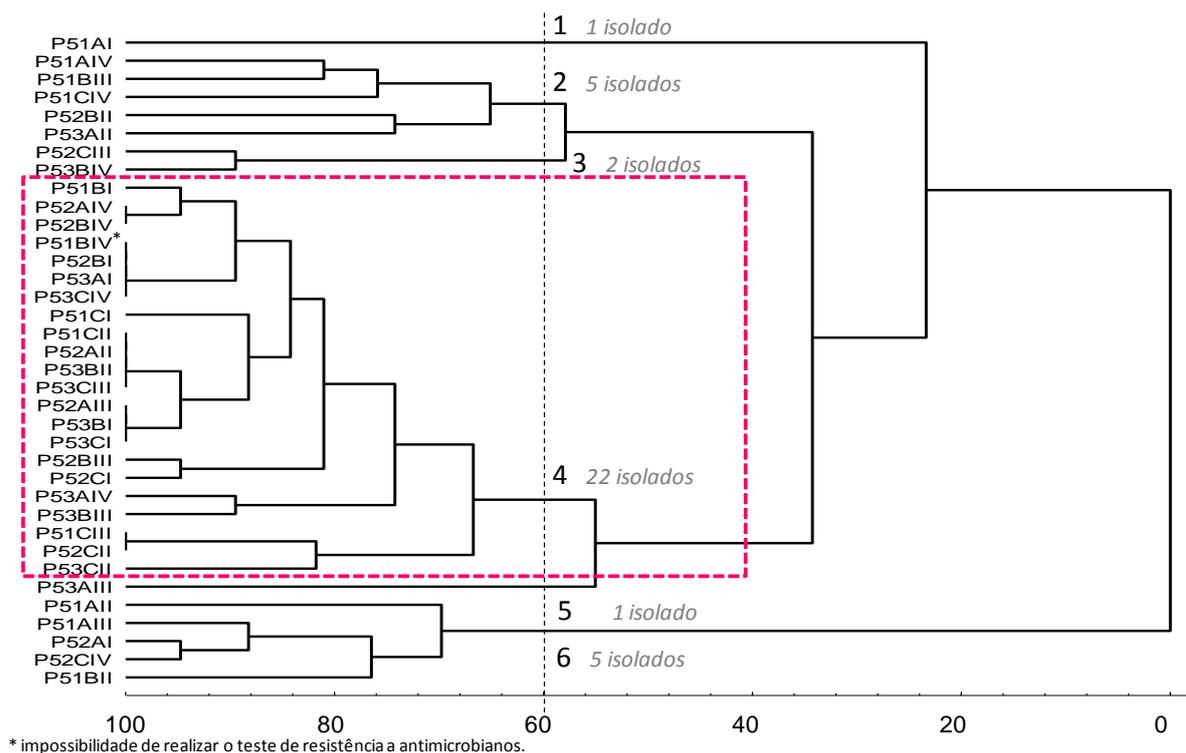


Figura 23 - Dendrograma de similaridade entre as trinta e seis colônias selecionadas no ponto 2 (P55, Rio, Wenceslau Braz), construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 60% de similaridade. * Impossibilidade de realização do teste de resistência a antimicrobianos.

Após a determinação dos grandes grupos representativos, foi realizada uma análise comparativa dos padrões de resistência dos isolados selecionados em cada grande grupo, para cada ponto de coleta, com a intenção de determinar uma possível variação nos padrões de resistência de acordo com o local amostrado. Considerando que a característica fenotípica do grande grupo selecionado possa ser extrapolada para todo o ambiente em questão. Os resultados estão apresentados na figura 24.

Apesar de o grande grupo selecionado do ponto de coleta 4 ter 20 isolados, houve impossibilidade de realização do teste de resistência a antimicrobianos com os isolados P41CIV, P43BI e P41BIII devido a falhas durante o procedimento de preparo do teste. Dessa forma, os cálculos foram realizados para um total de 17 isolados do grande grupo 4 do ponto de coleta P4. Também houve impossibilidade de realização do teste de resistência a antimicrobianos com o isolado P51BIV, os cálculos foram feitos para um total de 21 isolados do grande grupo 4, do ponto de coleta 5, conforme pode ser observado na figura 24.

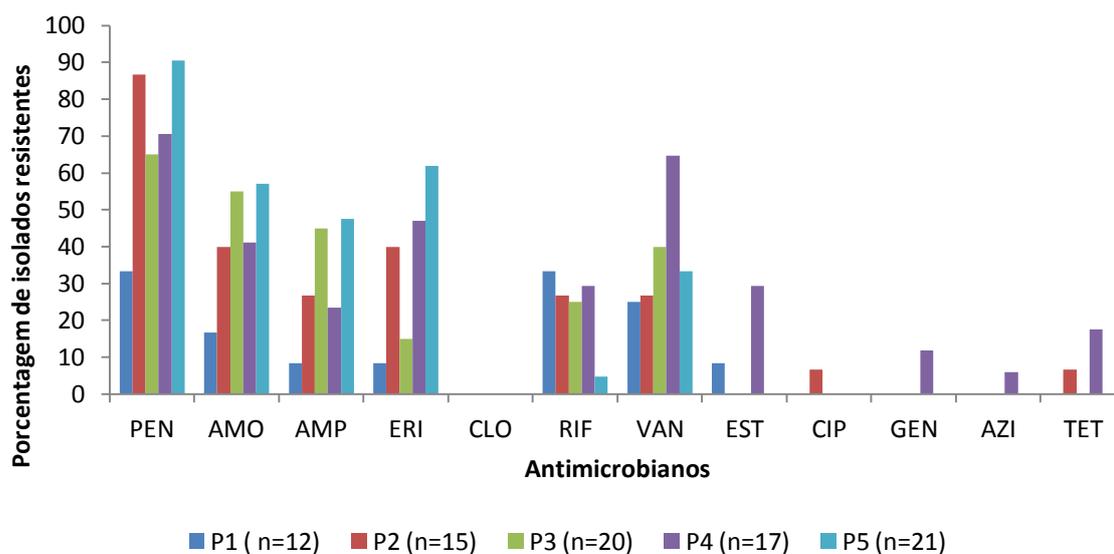


Figura 24 – Porcentagem de isolados resistentes, de acordo com o antimicrobiano analisado, do grande grupo fenotípico selecionado para cada um dos cinco pontos de coleta.

É possível observar que os antimicrobianos penicilina (PEN), amoxicilina (AMO), ampicilina (AMP), eritromicina (ERI), rifampicina (RIF) e vancomicina (VAN) foram os que apresentaram maior quantidade de isolados resistentes, em todos os pontos amostrados. A estreptomicina (EST) apresentou aproximadamente 8% dos isolados resistentes no ponto P1 e 29% no ponto P4. O ciprofloxacino (CIP) apresentou isolados resistentes no ponto P2, a tetraciclina (TET) apresentou isolados resistentes nos pontos P2 e P4 e a azitromicina (AZI) e gentamicina (GEN) apresentaram isolados resistentes no ponto P4. O cloranfenicol (CLO) foi o antimicrobiano mais eficiente não apresentando isolado resistente em nenhum dos grandes grupos representativos.

Pode ser verificado também, observando a figura 24, que os isolados selecionados da Cachoeira do Alegre, Brazópolis (P3) e do Rio Bica, Wenceslau Braz (P5) apresentaram uma menor variedade de resistência, sendo resistentes à penicilina, amoxicilina, ampicilina, eritromicina, rifampicina e vancomicina. Em compensação, de acordo com os isolados representativos, a amostra coletada na Cachoeira de Maria da Fé (P4) foi a que apresentou uma maior variedade de resistência, apresentando isolados resistentes a 10 antimicrobianos diferentes, sendo eles penicilina, amoxicilina, ampicilina, eritromicina, rifampicina, vancomicina, estreptomicina, gentamicina, azitromicina e tetraciclina.

Conforme esperado, os dados apresentados pelos grandes grupos selecionados, de cada ponto, segue um padrão comportamental semelhante à análise de todos os isolados, independente do ponto de coleta (figura 17).

Com os dados obtidos na análise dos isolados dos grandes grupos, foi confeccionado gráficos de setores indicando a porcentagem de isolados que foram sensíveis a todos os antimicrobianos, resistentes a pelo menos um antimicrobiano e multirresistente, quando apresentou resistência a dois ou mais antimicrobianos, que pode ser observado na figura 25.

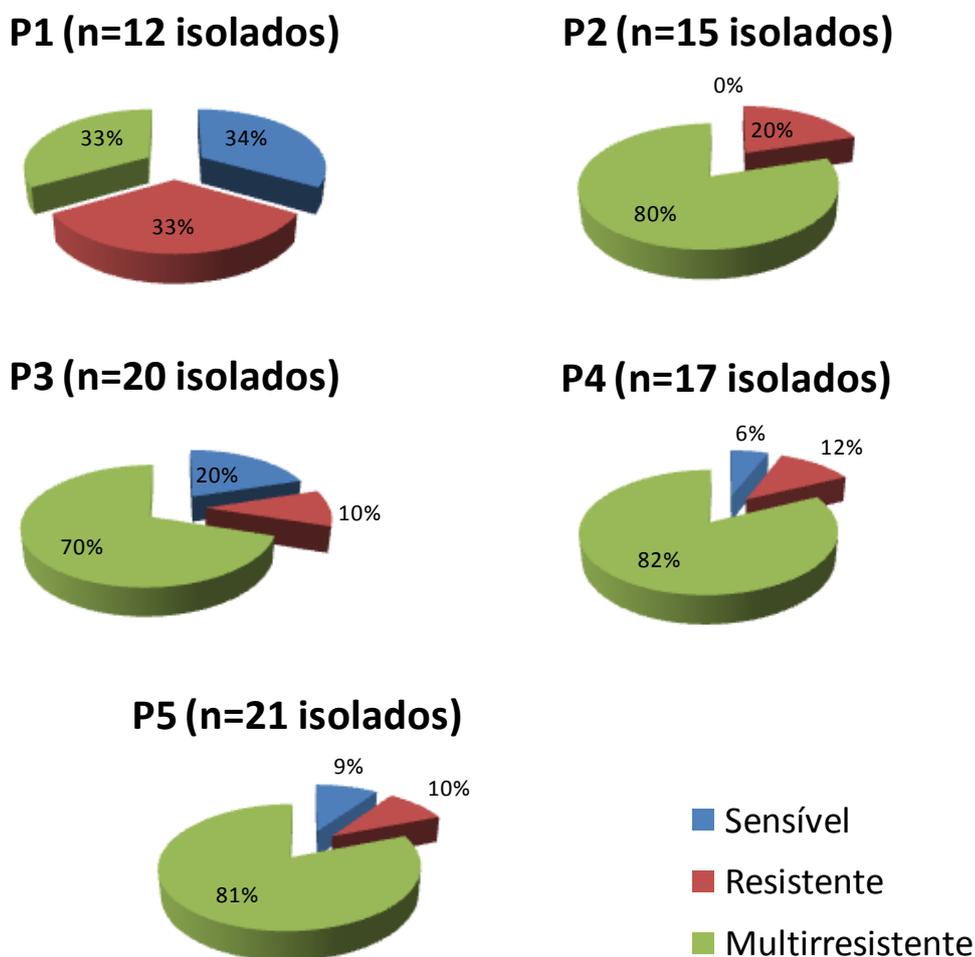


Figura 25 – Análise comparativa dos isolados selecionados como representativos dos pontos de coleta. P1 – Rio Sapucaí, Itajubá, 12 isolados selecionados; P2 – Cachoeira do Simão, Gonçalves, 15 isolados selecionados; P3 – Cachoeira do Alegre, Brazópolis, 20 isolados selecionados; P4 – Cachoeira de Maria da Fé, 17 isolados selecionados e, P5 – Rio Bicas, Wenceslau Braz, 21 isolados, quanto à característica fenotípica de resistência a antimicrobianos, sendo classificado como sensível (isolado sensível aos 12 antimicrobianos testados), resistente (quando isolado resistente a pelo menos um antimicrobiano) e multirresistente (quando apresentou resistência a dois ou mais antimicrobianos).

Na figura 25 é possível observar que com exceção do ponto de coleta P1, onde a quantidade de isolados resistente, multirresistente e sensível se mantiveram constante (33%), em todos os outros pontos verifica-se que há uma maior porcentagem de isolados multirresistentes, que varia desde 70% no ponto de coleta P3 à 82% no ponto P4, sendo mais

preocupante a situação dos isolados da cachoeira do Simão, P2, que possui 80% dos isolados multirresistentes e nenhum isolado selecionado foi sensível a todos os antimicrobianos analisados.

5.3.2 Análise comparativa de todos os pontos

De forma a facilitar a visualização do comportamento dos isolados de bactérias heterotróficas frente aos antimicrobianos, propôs-se uma análise de agrupamento com todos os isolados de todos os pontos de coleta, cujo resultado encontra-se na figura 26. Confirmando a grande semelhança de comportamento observada entre todos os pontos, é possível observar a formação de 3 grandes grupos com aproximadamente 90% de similaridade, indicando uma grande homogeneidade no padrão de resistência dos isolados selecionados, independentemente do ponto de coleta.

Esse comportamento homogêneo quanto ao padrão de resistência é preocupante uma vez que indica um alto índice de contaminação por agentes de resistência no ambiente, independente das condições de saneamento locais.

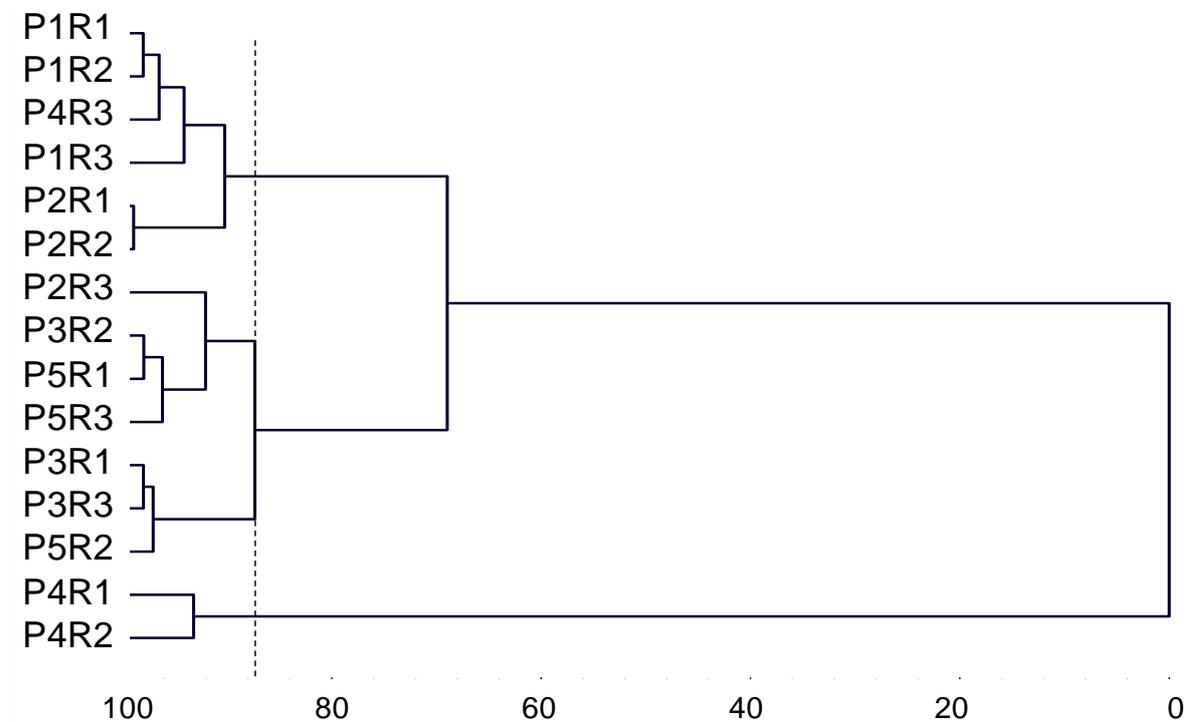


Figura 26 - Dendrograma de similaridade entre as três repetições (R1, R2 e R3) de cada um dos 5 pontos de coleta (P1, P2, P3, P4 e P5), construído por meio do seu padrão de resistência aos antimicrobianos analisados. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com aproximadamente 90% de similaridade.

6 CONCLUSÕES

- Os isolados bacterianos selecionados apresentam homogeneidade fenotípica e comportamental frente aos antimicrobianos, independente do ponto de coleta.
- As maiores frequências de resistência bacteriana a antimicrobianos são em relação à penicilina e seus derivados amoxicilina e ampicilina, assim como à eritromicina.
- O antimicrobiano mais eficiente em inibir o crescimento bacteriano é a gentamicina com somente um isolado resistente;
- A maioria dos isolados (75%) apresenta múltipla resistência, sendo resistente a dois antimicrobianos ou mais, e somente 10% dos isolados foram sensíveis a todos os avaliados.
- A alta quantidade de isolados de bactérias heterotróficas multirresistentes indica a necessidade de uma maior preocupação das autoridades em incluir as bactérias heterotróficas como variável para análise da qualidade de águas de recreação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de um grande número de isolados de bactérias heterotróficas apresentando múltipla resistência em amostras de águas utilizadas para recreação e dessedentação de animais é de extrema importância para a saúde pública por ser uma forma de disseminação de genes de resistência entre bactérias ambientais, alóctones e simbiontes de animais e seres humanos.

O estudo mostra a importância das bactérias heterotróficas (além do grupo coliforme) para a saúde pública. Por isso, sugere-se que estudos futuros abordem a relação entre bactérias heterotróficas e a contaminação ambiental por antimicrobianos ou genes de resistência, de modo que possa ser incorporada em análises recomendadas em futuras portarias de balneabilidade e também de potabilidade.

REFERÊNCIAS

- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotic: Are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**. v. 36, p. 697-705, 2005.
- ALLEN, M. J., EDBERG, S. C., REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water? **International Journal of Food Microbiology**. v. 92, p. 265-274, 2004.
- ANACLETO, E. I., GOMES, E. A. Relações tróficas no plâncton em um ambiente estuarino tropical: Lagoa dos Patos (RS), Brasil. **Saúde & Ambiente em Revista**. Duque de Caxias, v. 1, n. 2, p. 26-29, jul-dez 2006.
- ANVISA, 2008a – Registro de antibióticos do Brasil Ltda. Revisão: Agosto/2008. <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[26312-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[26312-1-0].PDF)>. Acesso em: 27 jan, 2013.
- ANVISA, 2008b – Fundação para o remédio popular – FRUP. Governo do Estado de São Paulo. <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25632-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25632-1-0].PDF)>. Acesso em: 27 jan, 2013.
- APHA, American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20th ed. APHA, AWWA, WEF, 1120pp. 1999.
- BARKOVSKII, A. L., THOMAS, M., HURLEY, D., TEEMS, C. Environmental factors responsible for incidence of antibiotic resistance genes in pristine *Crassostrea virginica* reefs. **Marine Pollution Bulletin**. v. 64, p. 2692-2698, 2012.
- BERALDO, R.M., FARACHE-FILHO, A. Bacteriological quality of irrigation water from vegetable gardens in the municipalities of Araraquara, Boa Esperança do Sul and Ibitinga, SP. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 3, p. 345-350, jul./set, 2001.
- BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 3ª ed. São Paulo: Melhoramentos. p.615-9; 658-9; 930-1; 938-9, 1994.
- BOUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIES, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45 p.493-496, 1966.
- BRASIL. Formulário Terapêutico Nacional 2010. Rename 2010. **Ministério da Saúde**. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. 2ª Ed. P.1140. Brasília, DF, 2010.
- CASTRO, A. M. V., QUEIROZ, A. L. M., ARAÚJO, E. L. B., NASCIMENTO, G. S. M., JESUS, I. A., VASCONCELOS, M. A. A., CABRAL, T. M. A., NASCIMENTO, G. G. Parâmetros microbiológicos de águas de rios coletadas em alguns municípios da Paraíba. X Encontro de Iniciação a docência, UFPB – **Resumos**, 2007. Disponível em: <<http://www.prac.ufpb.br/anais/IXEnex/iniciacao/documentos/anais/7.TECNOLOGIA/7CTD TQAMT01.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2010.
- CEFAR. **Antibiograma** - linha humana. Disponível em: <<http://www.cefarc.com.br/download/Bula%20Sensifar-Multifar7.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2012.

- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Norma Técnica L5.201**. Contagem de bactérias heterotróficas: método de ensaio. p. 14, São Paulo, ago. 2006.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Norma Técnica L5.214**. Coliformes Totais – determinação pela técnica de membrana filtrante: método de ensaio. p. 30, São Paulo, ago. 2007.
- CHOI, S.; CHU, W.; BROWN, J.; BECKER S.J.; HARWOOD, V.J.; JIANG, S.C. Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46 p.748-755, 2003.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. **DOU**. nº 18, de 25 de janeiro de 2001, Seção 1, p. 70-71. Ministério do Meio Ambiente, 2000.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Ministério do Meio Ambiente, 2005.
- DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, v.15 p. 375-382, 1994.
- DAVIS, J. Another look at antibiotic resistance. **Journal of General Microbiology**, v.138 p.1553-1559, 1992.
- DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A., OLEA, F., BERROCAL, C.I. Infecciones relacionadas con las aguas de recreo. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 7, p. 13-32, 2008.
- DOREVITCH, S., PANTHI, S., HUANG, Y., LI, H., MICHALEK, A.M., PRATAP, P., WROBLEWSKI, M., LIU, L., SCHEFF, P. A., LI, A. Water ingestion during water recreation. **Water research**, v. 45, p. 2020-2028, 2011.
- EVERITT, B.S. **Cluster analysis**. New York, J. Wiley, 1993.170p.
- FRAIMOW, H. S., TSIGRELIS, C. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: Mechanisms, epidemiology, and management of specific resistant pathogens. **Critical Care Clinical**. v. 27, p. 163-205, 2011.
- FREITAS, M.B., BRILHANTE, O.M., ALMEIDA, L.M. The importance of water testing for public health in two regions in Rio de Janeiro: a focus on fecal coliforms, nitrates, and aluminum. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, p.651-660. 2001. – Disponível em: <http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2001000300019&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 jul. 2010.
- FRICKS-LIMA, J., HENDRICKSON, C. M., ALLGAIR, M., ZHUO, H., WIENER-KRONISH, J.P., LYNCH, S. V., YANG, K. Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**. n. 37, p. 309-315. 2011.
- GANGLE, B. J. **Sources and occurrence of antibiotic resistance in the environment**. College Park: University of Maryland, 2005. 125p. Tese (Mestrado) - Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park, 2005.

- GARCIA-ARMISEN, T., VERCAMMEN, K., PASSERAT, J., TRIEST, D., SERVAIS, P., CORNELIS, P. Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. **Water Research**. v. 45, p. 788-796, 2011.
- GOMES-LUS, R. Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. **International Microbiology**, v. 1 p.279-284, 1998.
- GONI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, C.; QUENTIN, C. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 1, p.125-132, 2000.
- GUILLEMONT, D. Antibiotic use in humans and bacterial resistance. **Current Opinion in Microbiology**. v. 2, p. 494-498, 1999.
- HALLING-SORENSEN, B.J.; NIELSEN, S.N.; LANZKY, P.F.; INGERSLEV, F. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A Review. **Chemosphere**, v. 36 p.357-393, 1998.
- HEINEMANN, J.A., ANKENBAUER, R. G. AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? **Drug Discovery Today**. v. 5, n. 5, p. 195-204, 2000.
- HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **The Science of the Total Environment**, v. 225 p.109-118, 1999.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável – Brasil. **Estudos e Pesquisa, informação geográfica, número 5**. Rio de Janeiro, IBGE, p. 472, 2012.
- IGAM. Instituto Mineiro de Gestão das Águas. Gerência de Monitoramento Hidrometeorológico. Governo do Estado de Minas Gerais. Sistema Estadual de Meio Ambiente. **Monitoramento da qualidade das águas superficiais no Estado de Minas Gerais**. Relatório trimestral. 1º trimestre de 2012. p. 99. 2012
- KAMIZOULIS, G., SALIBA, L. Development of coastal recreational water quality standards in the Mediterranean. **Environmental International**, v. 30, p. 841-854, 2004.
- KRISTIANSSON, E., FICK, J., JANZON, A., GRABIC, R., RUTGERSSON, C., WEIJDEGÅRD, B., SÖDERSTRÖM, H., LARSSON, D. G. J. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. **PLoS ONE**. v. 6, n. 2, e17038, p. 1-7, 2011.
- LeCHEVALLIER, M. W., McFETERS, G. A. Interactions between heterotrophic plate count bacteria and coliform organisms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 49, n. 5, p. 1338-1341, maio 1985.
- LOBOVA, T.I.; BARKHATOV, Y.V.; POPOVA, L.Ye. Antibiotic resistance of heterotrophic bacteria in Shira Lake: natural and anthropogenic impacts. **Aquatic Microbiology and Ecology**, v. 30, p.11-18, 2002.
- MARTINEZ, J.L. Environmental pollution and antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Review. **Environmental Pollution**, v.157, p. 2893-2902, 2009.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., CALVO, J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para La salud pública. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, n. 4, . 4-9, 2010.
- McCUNE, B.; MEFFORD, M. J. **Multivariate analysis of ecological data**. Version 3.12. Glenden Beach: MjM Software, 1997.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **DOU**. nº 239, de 14 de dezembro de 2011, Seção 1, p. 39. Ministério da Saúde. 2011.
- MUDRYK, Z.J. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50 p.80-86, 2005.
- MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. Microbiologia médica. 6. ed. Elsevier Editora Ltda. Rio de Janeiro. 2010. Cap. 1 e 2.
- NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard** - 8.ed., v.23, n.1, NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NTAGIOPOULOS, P. G., PARAMYTHIOTOU, E., ANTONIADOU, A., GIAMARELLOU, H., KARABINIS, A. Impacto f na antibiotic restriction policy on the antibiotic resistance patterns of Gram-negative microorganisms in na Intensive Care Unit in Greece. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 30, p. 360-365, 2007.
- OLIVERA, A. J. F. C., FRANÇA, P. T. R., PINTO, A. B., Antimicrobial resistance of heterotrophic marine bacteria isolated from seawater and sands of recreational beaches with different organic pollution levels in southeastern Brazil: evidences of resistance dissemination. **Environmental Monitoring Assess**, v. 169, n. 1-4, p. 375-384. 2009.
- PAVIA, A. T. Advances in antimicrobial therapy. **Seminars in ediatric Neurology**. v. 6, n. 4, p. 288-298, dez. 1999.
- PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. Artigo técnico. **Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**. p.36-38, mar-abr 2009.
- PIANETTI, A.; BRUSCOLINI, F.; SABATINI, L.; COLANTONI, P. Microbial characteristics of marine sediments in bathing área along Pesaro-Gabicce coast (Italy): a preliminary study. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97 p.682-689, 2004.
- PIEREN, M., TIGGES, M. Development of adjunctive antibiotic therapies against antimicrobial resistance. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 12, p. 1-5, 2012.
- RECHE, M. H. L. R., PITTOL, M., FIUZA, L. M. Bactérias e bioindicadores de qualidade de águas de ecossistemas orizícolas da região sul do Brasil. **Oecologia Australis**. v. 14, n. 2, p. 452-463, 2010.
- RIBEIRO, C. M., BEZ-BATTI, E. C., YAMANE, A. T., FILA, A. E., BRUZAMOLIN, R. H., PASTORIO, S. C., CHIAMOLERA, L., FREITAS-LIDANI, K. C., Análise microbiológica do Rio Belém, Curitiba – PR. **Cadernos da escola de saúde**, Curitiba, v. 2, p.1-11, 2009.
- ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **American Society for Microbiology**, v. 51 p.365-379, 1987.
- SILVA, S. M., CARVALHO, L., QUEROL, E., QUEROL, M. V., GONÇALVES, J. F., Aspectos microbiológicos do arroio Salso de Cima e Rio Uruguai, na região urbana de Uruguaiana, RS, Brasil, **Biodiversidade Pampeana**, PUCRS, Uruguaiana, v. 6, n., p. 34 – 39, 2008.
- SOMMER, M. O. A., DANTAS, G. Antibiotics and the resistant microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 1 – 8, 2011.

STATISTICA. Statistic analysis. Versão 5.0. 1995.

STELMA JR, G. N., LYE, D. J., SMITH, B. G., MESSER, J. W., PAYMENT, P. Rare occurrence of heterotrophic bacteria with pathogenic potential in potable water. **International Journal of Food Microbiology**. v. 92, p. 249-254, 2004.

TEIXEIRA, J. C., LEAL, F. C. T. Desafios no controle de doenças de veiculação hídrica associadas ao tratamento e ao abastecimento de água para consumo humano. **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES**. VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Vitória, Espírito Santo, dez 2002.

TENOVER, F.C., MCGOWAN, J.E.Jr. Reasons for the emergence of antibiotic resistance. **American Journal of Medical Science**, v. 311 p.9-16, 1996.

TERRA, V. R., PRATTE-SANTOS, R., ALIPRANDI, R. B., BARCELOS, F. F., AZEVEDO Jr, R. R., BARBIÉRI, R. S., Avaliação microbiológica das águas superficiais do rio Jucu Braço Sul, ES, Brasil, **Natureza on line**. v. 6, n. 1 p. 48-52, 2008. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/09_TerraVRetal_4852.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2010.

THOMAZ, S.M. 1999. O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. Pp. 147-167. In: M.L.M. Pompêo (ed.). **Perspectivas da Limnologia no Brasil**. São Luís, MA. 198p.

VIGNESH, S., MUTHUKUMAR, K, JAMES, R. A. Antibiotic resistant pathogens versus human impacts: A study from three eco-regions of the Chennai coast, southern India. **Marine Pollution Bulletin**. v. 64, p. 790-800, 2012.

YANADA, M., YOKOKAWA, T., LEE, C. W., TANAKA, H., KUDO, I., MAITA, Y. Seasonal variation of two different heterotrophic bacterial assemblages in subarctic coastal seawater. **Marine Ecology Progress Series**. v. 204, p. 289-292, 2000.