

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

LUIZA CAMILA DA SILVA

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE USO CLÍNICO E A
BIOCIDA CLORADO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE DIFERENTES
AMBIENTES AQUÁTICOS DE UMA REFINARIA DE PETRÓLEO**

BELO HORIZONTE

2020

LUIZA CAMILA DA SILVA

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE USO CLÍNICO E A
BIOCIDA CLORADO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE DIFERENTES
AMBIENTES AQUÁTICOS DE UMA REFINARIA DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito para a obtenção do título
de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Vera Lúcia dos Santos

BELO HORIZONTE

2020

043

Silva, Luiza Camila da.

Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de uso clínico e a biocida clorado de bactérias isoladas de diferentes ambientes aquáticos de uma refinaria de petróleo [manuscrito] / Luiza Camila da Silva. - 2020.

96 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vera Lúcia dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Farmacorresistência Bacteriana. 3. Ambiente Aquático. 4. Tratamento de Efluentes Industriais. I. Santos, Vera Lúcia dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



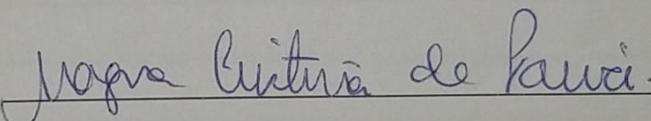
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

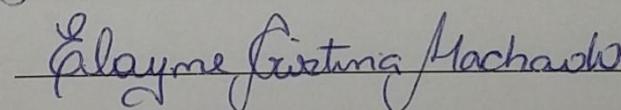
ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Luiza Camila da Silva
Nº REGISTRO: 2018685010

Às 14 horas do dia 05 de março de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelas Dr^{as}. Magna Cristina de Paiva, Elayne Cristina Machado e a Prof^a. Vera Lucia dos Santos – Orientador(a), para julgar o trabalho final "Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de uso clínico e a biocida clorado de bactérias isoladas de diferentes ambientes aquáticos de uma refinaria de petróleo", da aluna Luiza Camila da Silva, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

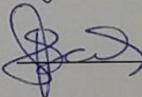
Dr^a. Magna Cristina de Paiva

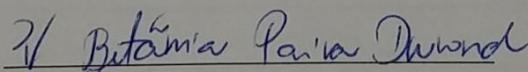


Dr^a. Elayne Cristina Machado



Prof^a. Vera Lucia dos Santos [Orientadora]





Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do PPGM/UFMG

RESUMO

A preocupação com a resistência bacteriana a antimicrobianos tem estimulado estudos sobre o assunto para além do ambiente hospitalar. Neste trabalho, ambientes aquáticos de uma refinaria de petróleo foram avaliados, desde a fonte de captação de água até a bacia da torre de resfriamento alimentada com água de reuso advinda dos tratamentos secundário e terciário dos efluentes industriais. Por meio de técnicas dependentes de cultivo, foram analisadas as alterações de densidade de bactérias totais e resistentes a antimicrobianos entre os diferentes pontos amostrais, bem como o perfil de suscetibilidade dos isolados frente a antimicrobianos de uso clínico e a biocida clorado. A maior parte dos isolados identificados pertence ao filo *Proteobacteria*, com destaque para *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. Cada ponto amostral apresentou variações entre densidades e composição populacional. Dos isolados testados, 62% apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, destacando-se a elevada proporção desses isolados logo após o tratamento secundário e a redução nas etapas subsequentes. Cerca de 45% dos isolados não foram suscetíveis a concentrações superiores a 25 mg/L de cloro ativo, porém não houve relação direta desses valores com resistência aos antimicrobianos. Este estudo demonstrou que há aumento de bactérias resistentes a antimicrobianos nas etapas de tratamento biológico e embora haja declínio na quantidade dessas bactérias após tratamento físico-químico, não são totalmente removidas e ainda podem ser recuperadas nos diferentes ambientes aquáticos estudados.

Palavras-chave: bactérias resistentes a antimicrobianos, ambientes aquáticos, tratamento de efluentes, controle microbiológico.

ABSTRACT

The concern with bacterial resistance to antimicrobials has stimulated studies on the subject beyond the hospital environment. In this work, we evaluate aquatic environments in an oil refinery, sampling from the water source intake to the cooling tower basin fed with reuse water from secondary and tertiary treatment of industrial effluents. Through cultivation-dependent techniques, changes in the density of total and antimicrobial-resistant bacteria between the different sample points were analyzed, as well as the susceptibility profile of the isolates against clinical antimicrobials and chlorinated biocide. Most of the identified isolates belong to the phylum *Proteobacteria*, with emphasis on *Pseudomonas* sp. and *Acinetobacter* sp. Each sample showed variations between densities and population composition. Of the tested isolates, 62% showed resistance to at least one antimicrobial, highlighting the high proportion of these isolates right after secondary treatment and the reduction in subsequent steps. Approximately 45% of the isolates were not susceptible to concentrations greater than 25 mg/L of active chlorine, but we did not find a direct relationship between these values and resistance to antimicrobials. This study demonstrated that biological treatment increases resistant bacteria and although there is a decline in the amount of these bacteria after physical-chemical treatment, they are not completely removed and can still be recovered in different aquatic environments.

Key-words: antimicrobial resistant bacteria; water environment; effluent treatment, microbial control.

Glossário

Antimicrobiano: substância que inibe a multiplicação ou destrói microrganismos. Neste trabalho, consideramos “antimicrobiano” como equivalente a “antibiótico”, de modo a englobar tanto fármacos naturais quanto sintéticos.

Biocida: substância química utilizada para controle microbiológico. Difere de antimicrobianos pelo contexto de utilização e mecanismo de ação amplo/inespecífico.

Lista de abreviações

BGN: bacilos Gram negativos

BGP: bacilos Gram positivos

BT: bacia da torre de resfriamento

BRA: bactéria resistente a antimicrobiano

CIM: concentração inibitória mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

ES: efluente industrial

ETA: estação de tratamento de água

ETE: estação de tratamento de efluentes

GRA: gene de resistência a antimicrobiano

LI: Lagoa de captação

NMP: número mais provável

SS: saída do tratamento secundário

ST: saída do tratamento terciário

UFC: unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	8
1.1. Tratamento de água e efluentes: etapas e processos	8
1.2. Diversidade bacteriana em sistemas industriais	10
1.3. Impacto dos microrganismos no maquinário industrial	12
1.4. Como se dá a formação do biofilme	13
1.5. Controle Microbiológico	14
1.6. Resistência bacteriana	16
1.7. Substâncias que exercem pressão seletiva e sua presença em ambientes aquáticos	19
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo Geral	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Área de estudo	25
4.2. Coleta e processamento de amostras	26
4.3. Quantificação e isolamento de bactérias heterotróficas totais por técnica <i>spread plate</i>	26
4.4. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes a antimicrobianos de importância clínica pela técnica de número mais provável (NMP).	27
4.5. Pesquisa de <i>Legionella</i> spp.	28
4.6. Identificação das bactérias	28
4.6.1. Identificação por MALDI-TOF/MS	29
4.6.2. Identificação molecular por sequenciamento do rDNA 16S	29
4.6.2.1. Extração de DNA dos isolados	29
4.6.2.2. Amplificação por PCR do rDNA 16s	30
4.6.2.3. Purificação e sequenciamento	30
4.7. Testes de suscetibilidade	31
4.7.1. Método de disco difusão	31
4.7.2. Método de microdiluição de antimicrobianos	32
4.7.3. Método de microdiluição de hipoclorito de sódio	33
4.7.4. Ensaio com diferentes tempos de exposição e concentrações de cloro	33
4.8. Ensaio de resistência adaptativa	34

4.9. Resistência cruzada	35
4.10. Análises estatísticas e de similaridade	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes a antimicrobianos de importância clínica pela técnica de número mais provável (NMP).	36
5.2. Isolamento e identificação das bactérias presentes nas amostras.	37
5.3. Testes de suscetibilidade a antimicrobianos e cloro	42
5.3.1. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de disco difusão	42
5.3.2. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de microdiluição	45
5.3.3. Ensaios com diferentes tempos de exposição e concentrações de cloro	47
5.3.4. Teste de suscetibilidade ao cloro pelo método de microdiluição	49
5.3.5. Resistência Adaptativa	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	61
8. REFERÊNCIAS	62
ANEXO A - Valores de densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes a antimicrobianos, representadas em UFC/mL e NMP/mL	71
ANEXO B - Análise de Variância e agrupamento por teste Scott-Knott dos pontos amostrados, no teste de NMP e plaqueamento para a quantidade total de bactérias	72
ANEXO C - Análise de Variância e agrupamento por teste Scott-Knott dos pontos amostrados, no teste de NMP para a quantidade de bactérias resistentes a Eritromicina, Ampicilina, Ciprofloxacino e Ceftriaxona	74
ANEXO D - Árvore taxonômica dos isolados identificados. De filo à espécie	77
ANEXO E - Códigos, locais de coleta e identificações, por MALDI-ToF ou sequenciamento do 16s, dos isolados	78
ANEXO F Suscetibilidade aos antibióticos testados por microdiluição e disco difusão	84
ANEXO G Valores médios de CIM e Desvio Padrão para diferentes espécies bacterianas sem valores de referência	92
ANEXO H Viabilidade dos isolados testados durante exposição a diferentes concentrações de cloro, em diferentes tempos	93
ANEXO I Análise de Variância e agrupamento por teste Scott-Knott dos pontos amostrados, no teste de suscetibilidade ao cloro por microdiluição	94
ANEXO J Correlação de Pearson para CIMs de Cloro e antimicrobiano	95

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Tratamento de água e efluentes: etapas e processos

De toda água captada no Brasil, 49,8% é destinada para irrigação, 24,4% para abastecimento urbano, 9,6% para indústria, 8,3% para abastecimento animal, 4,5% para termelétricas, 1,7% para abastecimento rural e 1,7% para mineração (ANA, 2019). Dado o histórico de crescimento econômico e populacional do país, a demanda de água é crescente. Nas últimas duas décadas, o aumento de captação de água foi estimado em 80% e a previsão é de que até 2030 tenha um aumento de mais 30%. Embora o país seja muito rico em recursos hídricos, a distribuição geográfica dos mesmos e diversidade dos índices pluviométricos nas diferentes estações do ano não favorece todas as regiões igualmente, tornando o país muito heterogêneo no quesito distribuição de água.

Outro aspecto importante é a heterogeneidade existente também nas estratégias de tratamento da água captada, dos efluentes gerados e de preservação das fontes de captação. Grande parte da água captada nos diferentes setores retorna para os corpos d'água. A água consumida no abastecimento urbano, por exemplo, retorna na forma de esgoto sanitário, e as usadas pela indústria como, águas residuárias. Assim, medidas de tratamento eficazes desses efluentes são necessárias para reduzir o impacto nos cursos hídricos receptores, de modo a não inviabilizar o uso posterior da água e reduzir riscos de doenças.

Segundo dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2019), no Brasil, apenas os estados Minas Gerais, Paraná e São Paulo e o Distrito Federal possuem índice de atendimento urbano com rede coletora de esgoto superior a 70%. Muitos municípios, mesmo possuindo rede coletora de esgoto, não possuem redes de tratamento adequadas para esses efluentes, compreendendo cerca de 18% da população. Estima-se ainda que apenas 43% da população urbana possui acesso a coleta e tratamento de esgotos, enquanto 27% são desprovidos de quaisquer desses serviços.

No setor industrial, 25,5% do consumo de água é destinado para a produção de derivados de petróleo e biocombustíveis, 55,8% para produtos alimentícios e o restante distribuído nos setores de produção de celulose, papel e derivados, metalurgia, produtos químicos e outros (ANA, 2017). Na indústria petrolífera utiliza-se água em todos os processos, sendo as maiores demandas nas etapas de dessalinização e resfriamento (cerca de

80% do total). Os sistemas de resfriamento são responsáveis por dissipar o calor residual gerado nos processos, de modo a preservar o funcionamento e durabilidade do maquinário (MCKELVEY; BROOKE, 1959). A água é o principal líquido de resfriamento, passando pelas partes aquecidas do sistema e retirando o calor excedente. Em um sistema semi-aberto, para perda do calor adquirido, a água entra em contato com o ar, de modo que haja a troca de calor entre esses dois meios e evaporação de parte da água. Essa interação ocorre em uma torre de resfriamento, sendo facilitada pelo gotejamento da água ou pelo uso de enchimento da torre, permitindo o contato laminar com o fluxo de ar que entra pelas laterais da torre ou por ventiladores (COOLING TOWER FUNDAMENTALS, 2011; MCKELVEY; BROOKE, 1959). A água resfriada é recolhida em bacias para armazenamento antes que seja novamente inserida no sistema, sendo muitas vezes necessário realizar uma purga e reposição da água devido à perda de volume e consequente concentração de componentes inorgânicos e matéria orgânica promovida pelo processo de evaporação (LIU et al., 2011).

Após o resfriamento, a água armazenada nas bacias das torres apresenta temperaturas entre 25 e 35 °C e pH próximo ao neutro (HALLAM et al., 2001). Essas condições somadas ao acúmulo de nutrientes ocasionado pela evaporação, à exposição a luz solar e ao ambiente externo, tornam o ambiente propício para a multiplicação microbiana (LIU et al., 2009; PAGNIER; MERCHAT; SCOLA, 2009).

A partir de 2012, observou-se uma restrição e diminuição do consumo de água, especialmente no setor industrial, devido à crise hídrica, ocasionada pelos baixos índices pluviométricos, tornando necessária a adoção de estratégias de reaproveitamento dos recursos disponíveis (ANA, 2019). Nesse contexto, o reuso de efluentes, mediante tratamento adequado, é uma opção sustentável de reutilização de água para diversas atividades como a irrigação, uso urbano e industrial, sendo notável o crescimento do uso em sistemas de resfriamento (DOS SANTOS et al., 2015; HONG et al., 2018). Essa medida reduz a demanda de captação de água, além de minimizar o despejo/retorno de efluentes para corpos d'água, garantindo maior segurança hídrica.

As estações de tratamento de efluentes podem apresentar distintos níveis de complexidade de acordo com as necessidades e recursos disponíveis. De modo geral, os tratamentos podem ser classificados como preliminar, primário, secundário e terciário, podendo ser utilizados individualmente ou em conjunto. O preliminar consiste em etapas mecânicas visando a proteção das unidades de tratamento subsequentes, inclui, por exemplo, grades grossas ou finas para remoção de sólidos grosseiros, desarenadores para remoção de

compostos orgânicos e inorgânicos sedimentáveis e caixas de retenção de óleo e gordura. O tratamento primário remove sólidos e matéria orgânica em suspensão, sólidos sedimentáveis e flutuantes; é composto pelas etapas de decantação e sedimentação, neutralização e precipitação química (coagulação/flotação). O tratamento secundário promove a remoção de matéria orgânica, em suspensão ou dissolvida, e de nutrientes, por processos biológicos, como a oxidação por bactérias aeróbias e/ou anaeróbias e a redução fotossintética por algas; para tanto podem ser utilizados lagoas de estabilização, lodos ativados, reatores anaeróbios e filtros biológicos. Já o tratamento terciário é uma etapa pouco utilizada em estações de tratamento de efluentes domésticos no Brasil, sendo direcionada a remoção de componentes específicos em locais que exigem alta qualidade do efluente lançados em corpos hídricos ou quando destinado ao reuso. Esse tratamento é responsável por remover resíduos indesejáveis restantes dos processos anteriores, como patógenos, nutrientes (nitrogênio e fósforo), micropoluentes e outros compostos recalcitrantes. Para isso, faz uso de técnicas como adsorção em carvão ativado, osmose reversa, eletrodialise, troca iônica, filtros de areia, oxidação química e física (como cloração e radiação UV, respectivamente). Para a remoção de patógenos, especificamente, podem ser empregados processos naturais, como a infiltração no solo ou lagoas de polimento com insolação, ou processos químicos, como a cloração e ozonização ou, ainda, processos físicos como a radiação ultravioleta e uso de membranas filtrantes (VON SPERLING, 1995; JORDÃO; PESSÔA, 2014).

1.2. Diversidade bacteriana em sistemas industriais

Pouco é conhecido sobre a diversidade microbiana em sistemas industriais ((DI GREGORIO et al., 2017; PEREIRA et al., 2017; WANG et al., 2013). Entre os fatores que afetam esse conhecimento, há a dificuldade de coleta, seja pela difícil acessibilidade física de determinados locais ou mesmo autorização por parte das indústrias (DI PIPPO et al., 2018); seguido pelo interesse único em espécies patogênicas e a dificuldade de identificação de bactérias não clínicas, uma vez que a maioria não é bem caracterizada ou de difícil cultivo em laboratório (STEWART, 2012). Tem sido sugerido que no ambiente aquático, menos de 0,1% das espécies são cultiváveis. Outro empecilho é que estudos focados unicamente em bactérias indicadoras de contaminação por dejetos humanos (JJEMBA et al., 2010) utilizam meios de cultura seletivos que promovem a seleção dessas espécies, acarretando em uma falsa predominância das mesmas, enquanto o uso de outras técnicas muitas vezes não detecta

as espécies dada sua quantidade praticamente irrelevante frente a diversidade das demais (VAZ-MOREIRA; NUNES; MANAIA, 2014).

Para conhecer melhor as comunidades bacterianas, pode-se ir além de técnicas dependentes de cultivo e aplicar técnicas de metagenômica, para sequenciar o genoma dos microrganismos ali presentes de modo a identificá-los e predizer sua função nesses ambientes (KUNIN et al., 2008; RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003). Outra abordagem é a metatranscriptômica que estuda as funções e atividades das sequências de RNA transcritos por toda uma comunidade de microrganismos presentes em determinado ambiente, permitindo a análise de expressão e atividade gênica quanto a sua diversidade e abundância sob condições específicas (AGUIAR-PULIDO et al., 2016). Em ambientes aquáticos industriais, grande parte da população bacteriana é composta por bactérias carregados pelo ar e água de reposição (DOS SANTOS et al., 2015). Porém, é notável a variação na biodiversidade encontrada em cada estudo, decorrente das diferentes condições físicas e químicas de cada local e as variações entre comunidades planctônicas e sésseis, uma vez que algumas espécies possuem baixa capacidade de adesão (DI GREGORIO et al., 2017; VAZ-MOREIRA; NUNES; MANAIA, 2014; WANG et al., 2013).

O patógeno de maior interesse em ambientes aquático é *Legionella pneumophila*, causadora de pneumonia quando inalada em aerossóis ou gotículas de água contaminada (BROUSE; BROUSE; BROUSE, 2017; DI PIPPO et al., 2018; PEREIRA et al., 2017). Pela grande importância e destaque de *L. pneumophila* em sistemas de resfriamento, outros potenciais patógenos acabam negligenciados, mas alguns trabalhos se dedicaram à pesquisa de *Mycobacterium* sp. (TORVINEN et al., 2014), *Pseudomonas aeruginosa* e espécies mesófilas de *Aeromonas* sp. (BLASCO; ESTEVE; ALCAIDE, 2008).

Alguns estudos já demonstraram que torres de resfriamento podem abrigar patógenos, especialmente quando a água de reposição é proveniente de estações de tratamento de efluentes municipais ou de fontes impactadas pela ação humana. Estas fontes também contribuem para maior disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento de bactérias, fungos, algas e protozoários (BLASCO; ESTEVE; ALCAIDE, 2008; BREIMAN, 1996; CHOI et al., 2010; DIAS-SOUZA; SOARES; DOS SANTOS, 2017; JJEMBA et al., 2010; LIU et al., 2010; VAZ-MOREIRA; NUNES; MANAIA, 2014; WINGENDER; FLEMMING, 2011).

Em estudos prévios de nosso grupo, em torres de resfriamento que recebem água de reuso, foram identificadas bactérias potencialmente patogênicas, a exemplo *P. aeruginosa*,

Klebsiella pneumoniae (dados não divulgados), *Elizabethkingia meningoseptica*, *Acinetobacter junii*, *Kluyvera cryocrescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Enterobacter hormaechei* (DIAS-SOUZA; SOARES; DOS SANTOS, 2017).

Mesmo que as espécies tipicamente presentes nesses sistemas não ofereçam um risco direto à saúde humana, é preciso precaução. Um ponto crescente de discussão é a possibilidade de disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (GRAs) entre bactérias ambientais e aquelas de interesse clínico, afinal não se sabe ao certo as consequências dessa interação tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (BECERRA-CASTRO et al., 2016; CROFTS; GASPARRINI; DANTAS, 2017; WELLINGTON et al., 2013).

1.3. Impacto dos microrganismos no maquinário industrial

No contexto industrial, a presença de microrganismos, especialmente na forma de biofilme, gera altos impactos econômicos, relacionados a perda de eficiência e a degradação do maquinário. Muitas bactérias têm a capacidade de alternar entre o estado planctônico (livre ou disperso no líquido) e o sésil (aderidas a um material suporte, formando biofilme), conforme permitam as condições do meio (RABIN et al., 2015). Devido às vantagens conferidas às células microbianas, a forma sésil é mais encontrada naturalmente, pois confere resistência a estresses ambientais e a presença de substâncias que possam trazer danos às células, além de favorecer a interação entre microrganismos e sua permanência em superfícies (FLEMMING et al., 2016). Biofilmes bacterianos são compostos em sua maioria por bactérias heterotróficas totais (BHT), que usam matéria orgânica do meio circundante ou componentes do próprio biofilme como fonte de carbono e energia (MELO; AZEVEDO, 2008), mas também podem albergar bactérias de outros padrões nutricionais e outros grupos como fungos, algas e protozoários (FLEMMING et al., 2016).

Os biofilmes formam-se principalmente em locais que apresentam condições favoráveis, como temperatura amena, fluxo lento e abundância de substrato (ECKERT, 2015). Além de promover acúmulo de matéria orgânica, as bactérias agravam a incrustação mineral nas superfícies, que também obstrui as tubulações, uma vez que componentes da matriz podem atrair íons metálicos e cristais de sais dissolvidos na água aumentando a incrustação mineral (BEECH; SUNNER, 2004; O'NEAL; GUILLEMOT, 2010). Os biofilmes formados dificultam a troca de calor nos sistemas de resfriamento, dada a baixa

condutividade térmica dos biofilmes em relação a água e aos materiais metálicos e o aumento do atrito acarreta perda de energia (DOĞRUÖZ et al., 2009; LUDENSKY, 2003; RAO, 2012), além de acelerar a corrosão, nesse caso chamada biocorrosão, de tubulações e superfícies metálicas em geral (COETSER; CLOETE, 2005; RAO, 2012). A biocorrosão ocorre principalmente pela ação de bactérias redutoras de sulfato, bactérias oxidantes de enxofre e de ferro, ocasionando reações de oxirredução que atacam e deterioram o metal ou pela produção de substâncias orgânicas secretadas para o meio extracelular e metabólitos corrosivos advindos da fermentação (GU, 2012; XU et al., 2013). Com isso, o acúmulo de biofilme além de sobrecarregar os equipamentos, acarreta em sua substituição prematura e aumento na frequência das operações de manutenção (LUDENSKY, 2003).

1.4. Como se dá a formação do biofilme

É preciso a adesão de apenas uma célula bacteriana planctônica em uma superfície para que se tenha o início da formação do biofilme. A princípio, a adesão é aleatória e reversível, sendo feita por meio da atração entre as cargas elétricas da bactéria e da superfície, podendo ser facilitada em superfícies rugosas ou pela presença de estruturas bacterianas como proteínas externas de membrana, flagelos, fímbrias e pili (RENNER; WEIBEL, 2011).

As interações entre microrganismos e superfície são reforçadas pela adesão de novos microrganismos e produção de matriz, com a formação de microcolônias (RABIN *et al.*, 2015). A matriz confere proteção às células e estrutura ao biofilme, sendo produzida pelos próprios microrganismos e liberada para o meio externo, podendo ser composta por uma ou mais substâncias poliméricas extracelulares (SPEs) de natureza polissacarídica, peptídica, lipídica ou de ácidos nucleicos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

No processo de maturação, as microcolônias aumentam de tamanho pela agregação de novos microrganismos e multiplicação dos já presentes, até a formação de um biofilme maduro. Este não é apenas uma massa de microrganismos diversos envoltos por uma matriz, mas uma comunidade complexa com uma estrutura contendo poros e canais para circulação de água e troca de nutrientes e metabólitos (FLEMMING et al., 2016). Isto resulta na estratificação do biofilme, com formação de gradiente de concentração de oxigênio e nutrientes, de modo que diferentes tipos bacterianos, com diferentes exigências nutricionais, de pH e oxigênio, possam se desenvolver. Por exemplo, as camadas mais distantes à superfície favorecem o estabelecimento de espécies anaeróbias, onde a concentração de

oxigênio é menor. A menor quantidade de nutrientes nas camadas inferiores promove um metabolismo bacteriano mais lento, de modo que muitas espécies podem ficar em estado latente (FLEMMING et al., 2016). Por outro lado, a estratificação também dificulta a difusão de biocidas e outros antimicrobianos, reduzindo-os para uma concentração subinibitória ou impedindo sua ação, favorecendo a persistência de bactérias resistentes a antimicrobianos (BRAs) (RABIN et al., 2015). A etapa de dispersão é caracterizada pelo desprendimento de microrganismos ou de fragmentos do biofilme, podendo ocorrer por sinais de *quorum-sensing*, por falta de nutrientes, competição intensa, excesso populacional ou por fatores externos como atrito, raspagem e uso de agentes químicos dispersantes (KAPLAN, 2010; RABIN et al., 2015). Os microrganismos dispersos no meio podem formar novos biofilmes em outras superfícies.

1.5. Controle Microbiológico

Os padrões de qualidade microbiológica para água dependem da finalidade de seu uso, logo o padrão da água destinada ao consumo humano é muito diferente da destinada ao uso em sistemas de resfriamento. Para exemplificar, a portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde estabelece um limite inferior a 500 UFC/mL de bactérias heterotróficas totais (BHT) para água potável enquanto as densidades aceitáveis de BHT em torres de resfriamento são inferiores a 10^4 UFC/mL para bactérias planctônicas e a 10^5 UFC/cm² para as associadas a biofilmes (LUDENSKY, 2005). O controle microbiológico da água pode se dar por métodos físicos (calor, filtração, radiação, ultrassom) químicos (cloração, iodação, ozonização) ou biológicos (enzimas e fagoterapia) (LUDENSKY, 2005; THANKI, 2004). Entre os métodos químicos mais utilizados na indústria está o uso de biocidas, podendo ser estes oxidantes (cloro, ozônio e peróxido de hidrogênio) ou não oxidantes (aldeído, aminas e isotiazolonas) (LUDENSKY, 2005).

Os biocidas podem ser utilizados isoladamente ou em associação com outros biocidas ou outros produtos, podendo ser aplicados de forma contínua, em doses pulsadas ou em cargas de choque (BOTT, 2009). Produtos que auxiliam no controle microbiológico incluem surfactantes e dispersantes, que por serem moléculas anfipáticas, como compostos contendo sulfatos e quaternário de amônio, adentram a matriz do biofilme facilitando seu rompimento (CLOETE, 1998; MACDONALD; SANTA; BRÖZEL, 2000).

Embora existam muitas opções de biocidas e dispersantes eficazes no mercado, é crescente a preocupação com o impacto ambiental e com a saúde do trabalhador, levando à pesquisa e desenvolvimento de produtos eficientes, porém biodegradáveis, menos tóxicos e que, preferencialmente, apresentem baixo custo (ROBECK, 1981; ZHENG et al., 2013). Isto tem estimulado estudos direcionados ao uso de microrganismos e seus produtos no combate a outros microrganismos. Assim, o uso de vírus que infectam bactérias (WU; WANG; FANE, 2017), biosurfactantes como os ramnolipídeos (KIM et al., 2015) ou moléculas que interferem na “comunicação” bacteriana seja por manipulação e mimetização dos autoindutores (sinalizadores celulares do *quorum-sensing*) ou, ainda, por sua degradação e uso de moléculas competidoras (*quorum-quenching*) (BRACKMAN; COENYE, 2014; FENG; WU; YU, 2013; FETZNER, 2014; KIM et al., 2014; PONNUSAMY et al., 2013), mostram-se alternativas promissoras para a remoção de biofilmes.

O cloro é o principal agente químico desinfetante utilizado no tratamento de água, por sua alta eficácia e baixo custo. Quando adicionado a água, tem-se uma reação dependente de pH, com a formação de ácido hipocloroso (HOCl), favorecida por pH entre 5 e 10. O ácido hipocloroso é o responsável primário pela ação desinfetante e oxidante, que por sua vez também se dissocia formando o íon hipoclorito (ClO⁻). O cloro residual livre é determinado pela quantidade de ácido hipocloroso e íon hipoclorito (MEYER, 1994).

A ação antimicrobiana do cloro dá-se de diferentes maneiras, a maioria relacionada ao alto pH da solução. Quando em contato com uma célula microbiana o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito interferem diretamente na integridade da membrana citoplasmática, pela reação de saponificação que ocorre com os ácidos graxos, ocasionando desestruturação da bicamada lipídica; ligam-se com grupos amino, neutralizando-os e formando cloraminas, moléculas que interferem no metabolismo celular e desencadeiam processos de peroxidação em todo o citoplasma. O íon cloro proporciona a oxidação irreversível de grupos sulfidrilas (SH) de enzimas essenciais. A ação oxidante promove, ainda, a inibição enzimática pela troca de hidrogênios por íons cloro (ESTRELA; BARBIN; PÉCORA, 2002). Apesar da eficiência e baixo custo no uso de cloro, há desvantagens consideráveis, pois quando a matéria orgânica interage com o cloro há a formação de compostos sem ação oxidante/desinfetante e que podem apresentar riscos à saúde, por serem carcinogênicos e tóxicos, como os organoclorados, trihalometanos e cloraminas (BOTT, 2009). Outra desvantagem é a aceleração da oxidação das tubulações metálicas, causando danos aos sistemas industriais (PERES et al., 2008).

1.6. Resistência bacteriana

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos são um fenômeno natural, e certamente inicialmente não tinham relação alguma com os antimicrobianos usados como medicamentos. Foram encontrados genes de resistência a β -lactâmicos, tigeciclina e glicopeptídeos em *permafrost* com mais de 30.000 anos, porém esses fármacos só começaram a ser utilizados na segunda metade do século XX (D’COSTA et al., 2011). Esses mecanismos de resistência são vantagens evolutivas importantes para a sobrevivência dos microrganismos em situações adversas, como a presença de metais pesados e xenobióticos (como alguns antimicrobianos e pesticidas usados na agricultura), e mesmo como um fator de competição com outros microrganismos por espaço físico e nutrientes.

Os mecanismos de resistência apresentados por BRAs podem ser intrínsecos ao microrganismo, decorrentes de características de parede, por exemplo, ou mutações aleatórias transmitidas entre as gerações (transferência vertical) ou ainda podem ser adquiridos do material genético de outros microrganismos, nesse caso denominada transferência horizontal, conforme será tratado mais adiante (LEKUNBERRI; BALCÁZAR; BORREGO, 2018).

A resistência pode se expressar de diferentes formas, como a diminuição de permeabilidade da membrana externa, especialmente pela alteração da quantidade e diâmetro de porinas; a ação de bombas de efluxo, impedindo o acúmulo do fármaco dentro da célula; modificações estruturais do local-alvo, reduzindo a afinidade do antimicrobiano ao sítio de ação e a produção de enzimas capazes de degradar antimicrobianos (TENOVER, 2006).

Outra forma de resistência é a formação de biofilme, pois este confere proteção para os microrganismos (LUDENSKY, 2003). Tal proteção está associada principalmente ao efeito de barreira exercido pela matriz, que dificulta ou impede a difusão dos agentes antimicrobianos ao longo do biofilme (CHUARD et al., 1993; LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014). A concentração necessária de agentes para remoção de biofilmes pode ser de 100 a 1000 vezes maior do que a usada para erradicar microrganismos planctônicos (LUCCHESI, 2012).

A transferência horizontal de GRAs pode ocorrer por quatro mecanismos: a transformação, quando a bactéria capta material genético extracelular e o incorpora ao seu próprio DNA; a conjugação quando duas bactérias de espécie igual ou distintas trocam fragmentos de material genético ou plasmídeos (DNA circular independente do DNA

genômico); a transposição que envolve elementos genéticos móveis, como transposons e sequências de inserção, que são capazes de alterar a expressão de genes próximos e mesmo causar deleções ou inversões nas sequências adjacentes; e a transdução, caracterizada pela incorporação de um fragmento de DNA mediada pela ação de um bacteriófago (LEKUNBERRI; BALCÁZAR; BORREGO, 2018). As bactérias Gram negativas representam a maior parte das espécies emergentes multirresistentes a antimicrobianos, isso devido especialmente a sua capacidade de compartilhar plasmídeos (EXNER et al., 2017). Outros eventos importantes associados à resistência são as chamadas resistência cruzada e corresistência, que ocorrem quando a bactéria possui um mecanismo de resistência comum a vários antimicrobianos, xenobióticos ou metais pesados. A corresistência ocorre quando dois ou mais genes, que conferem resistência a substâncias distintas, estão alocados no mesmo elemento genético, sendo expressos simultaneamente por um gene regulador frente ao fator estressor; a resistência cruzada ocorre quando um mecanismo de resistência ou resposta celular resulta em resistência a mais de uma substância (SANSEVERINO et al., 2018).

Águas residuais estão entre os ambientes que recebem grandes quantidades de resíduos químicos, como desinfetantes e antimicrobianos, além de matéria orgânica e microrganismos, provenientes tanto de residências quanto de indústrias e hospitais. Mesmo após o tratamento convencional, resíduos de antimicrobianos e genes de resistência podem não ser totalmente removidos (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2015), de modo que o aumento da resistência torna-se uma consequência da exposição das bactérias a tais produtos químicos e da disseminação de GRAs, que progressivamente vão se acumulando na natureza. Assim, quando considerado um ambiente como solo ou água, haverá muitas BRAs e GRAs, dada a complexidade natural desses ambientes e as intervenções associadas à ação humana (D’COSTA et al., 2006; LEKUNBERRI; BALCÁZAR; BORREGO, 2018). Ao conjunto de genes associados a resistência das comunidades microbianas, dá-se o nome de resistoma. Tem-se mostrado a alteração do resistoma ao longo do tempo, KNAPP et al. (2010) compararam amostras de solo coletadas em 2008 com solo arquivado de 1940. Os autores descreveram um aumento de 15 vezes na quantidade de genes de resistência a tetraciclina e, ainda, aumento significativo na resistência a β -lactâmicos e eritromicina. Essa elevação na resistência tem sido atribuída principalmente a pressão seletiva associada à exposição das bactérias a antimicrobianos, biocidas ou metais pesados, que resulta na seleção de espécies resistentes presentes nesses ambientes que passam a predominar em relação as suscetíveis (VAZ-MOREIRA; NUNES; MANAIA, 2014).

De acordo com KOHANSKI; DEPRISTO; COLLINS (2010), doses subinibitórias de alguns antimicrobianos geram espécies reativas de oxigênio (EROs), contra as quais alguns microrganismos possuem mecanismos de proteção. Entre os antimicrobianos indutores dessa resposta, estão principalmente os bactericidas, como quinolonas, aminoglicosídeos e alguns β -lactâmicos. As respostas ao estresse oxidativo incluem a diminuição de permeabilidade da membrana, reparo de danos celulares e até a mudança para o estado de biofilme. Por sua característica instável e oxidativa, EROs causam danos ao DNA celular podendo causar morte bacteriana ou mesmo mutações. Essas mutações induzidas podem resultar em resistência a antimicrobianos. Tanto as alterações fenotípicas quanto as genéticas, proporcionadas por EROs, podem levar à uma variabilidade populacional cujas características de resistência estão presentes em apenas alguns indivíduos, sendo chamada heterorresistência, e a persistência da pressão antimicrobiana pode levar à seleção definitiva das mesmas (MARTÍNEZ, 2017).

Em estações de tratamento de água (ETAs) e estações de tratamento de efluentes (ETEs), a transferência gênica horizontal pode ser facilitada visto a presença de grande quantidade de bacteriófagos que mediarão o mecanismo de transdução (HONG et al., 2018). Outro fato importante é a cloração, que tem sido apontada como um fator que altera a quantidade de BRAs e GRAs. Alguns estudos demonstram que a cloração diminui substancialmente a quantidade de microrganismos e GRAs em ETAs, como o conduzido por LIN et al. (2016), que constataram que de 125 GRAs, 119 sofreram redução com a cloração, bem como 12 dos 13 elementos genéticos móveis monitorados. Já RODRIGUEZ-MOZAZ et al. (2015) compararam a quantidade de resíduos de antimicrobianos e GRAs presentes em efluentes hospitalar e doméstico antes e após passarem por uma estação de tratamento. Foi verificado que mesmo que a quantidade tenha diminuído, a maioria dos antimicrobianos não foi totalmente removida, enquanto que a quantidade relativa dos genes *ermB* e *tetW* diminuiu e de *bla*_{TEM}, *qnrS* e *sulI* aumentou. Avaliando o impacto ocasionado no rio que recebia os efluentes da estação de tratamento, os autores também observaram o aumento de GRAs e resíduos de antimicrobianos em relação a água acima ao ponto de descarga. Tal padrão de aumento também foi observado no estudo de LIU et al. (2018), que monitoraram a ocorrência de 22 GRAs em uma estação de tratamento de águas residuárias urbanas na qual era utilizado dióxido de cloro como agente biocida. Foi observado aumento de GRAs, especialmente a macrolídeos, sulfonamidas, β -lactâmicos, aminoglicosídeos, rifampicina e vancomicina. Deve-se ainda considerar que possíveis divergências de informações entre estudos podem

estar associadas às condições iniciais da água tratada, com a procedência, o tipo de tratamento adotado e ainda com as metodologias utilizadas para detecção dos GRAs e BRAs (GUARDABASSI; LO FO WONG; DALSGAARD, 2002; MANAIA et al., 2018). Em indústrias, o foco do controle microbiológico é a manutenção e bom funcionamento dos sistemas, com pouca atenção para o risco microbiológico associado a saúde, excetuando o monitoramento da presença de *Legionella* spp. A pesquisa de GRAs e BRAs é ainda mais escassa. BLASCO, ESTEVE e ALCAIDE (2008) pesquisaram a ocorrência de patógenos com resistência a 27 antimicrobianos tanto em ambientes naturais quanto em torres de resfriamento, observando que embora a maioria dos isolados de *L. pneumophila* tenham apresentado sensibilidade aos fármacos testados, a grande maioria de *P. aeruginosa* e *Aeromonas* sp. apresentaram resistência, inclusive a múltiplos fármacos.

1.7. Substâncias que exercem pressão seletiva e sua presença em ambientes aquáticos

Os estudos referentes à resistência bacteriana a antimicrobianos deixaram de estar restritos ao ambiente hospitalar e foram ampliados para outros setores como o agropecuário, sistemas de tratamento de água e efluentes, sistemas industriais como as torres de resfriamento, e ambientes naturais como solo e água (WESTPHAL-SETTELE et al., 2018). Tal fato ocorre pelo uso de antimicrobianos além do contexto da saúde humana, sendo também aplicada na agricultura e criação de animais, como pecuária e aquacultura (CABELLO, 2006; ECONOMOU; GOUSIA, 2015), além da observação de que outros compostos químicos também exercem pressão seletiva sobre os microrganismos.

Tanto é importante essa nova realidade que em 2015 a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou o Plano de Ação Global em Resistência a Antimicrobianos, para que países do mundo todo promovam novas estratégias em busca de melhora ou ao menos de contenção do problema de resistência aos antimicrobianos, especialmente com o uso mais responsável de substâncias antimicrobianas. No Brasil, o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR, 2018) conta com a participação conjunta do Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério das Cidades, Ministério da Educação e Cultura, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, Ministério do Meio Ambiente, Fundação Nacional de Saúde, além do apoio do Conselho Nacional de Saúde e da

Agência Nacional de Águas, mostrando mais uma vez que esse é um problema multifatorial e que atinge diversos setores. Como já mencionado, mesmo substâncias sem ação antimicrobiana direta podem estar envolvidos na seleção de BRAs, tanto pela pressão seletiva quanto por mecanismos de resistência cruzada. Por isso, a seguir será tratado, além de antimicrobianos de uso clínico, como biocidas, agrotóxicos e metais pesados podem chegar em ambientes aquáticos e promover a alteração no perfil de suscetibilidade das comunidades bacterianas.

Conforme levantamento da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*), em 2016, o Brasil registrou o consumo de 2.225,47 toneladas de antimicrobianos, distribuídos principalmente entre β -lactâmicos (53,4%), macrolídeos (16,2%), quinolonas (12,4%), tetraciclina (3,4%) e sulfonamidas (5,3%). A média mundial é de que cerca de 70% desses antimicrobianos são destinados ao setor de alimentos e criação de animais (WHO, 2018). No setor agropecuário são utilizados tetraciclina, aminoglicosídeos, β -lactâmicos, lincosamidas, macrolídeos e sulfonamidas para tratamento de infecções, profilaxia de doenças e doses sub-terapêuticas para engorda e crescimento dos animais (MANYI-LOH et al., 2018).

Vários estudos já relataram a presença de resíduos de medicamentos, inclusive antimicrobianos, em água de esgoto, ETAs e em rios (MAHMOOD; AL-HAIDERI; HASSAN, 2019; STUMPF; TERNES; WILKEN, 1999). Tem sido sugerido que cerca de 30 a 90% dos antimicrobianos administrados não são metabolizados e acabam excretados em sua forma ativa (SANSEVERINO et al., 2018). Uma revisão avaliou trabalhos de diferentes países, totalizando informações de 267 amostras de ETAs e constatou que a detecção de resíduos de antimicrobianos era um fator comum em vários deles (SANSEVERINO, 2018). Sulfametoxazol foi o mais prevalente, sendo encontrado em 31 amostras de 13 países, seguido de ciprofloxacino, trimetoprima, claritromicina, eritromicina, clindamicina e azitromicina. Quando avaliado a remoção desses antimicrobianos durante os processos de tratamento, constatou-se que muitos não são totalmente removidos. Ciprofloxacino foi relatado como o fármaco de maior remoção, chegando a 90%, porém sua persistência ao atingir o solo pode ser de 90 dias, por exemplo em casos de uso do lodo seco como fertilizante. Em média, as dosagens encontradas eram baixas, em Portugal, por exemplo, variou entre 0,28 e 0,69 $\mu\text{g/L}$ para diversos antimicrobianos, mas nos Estados Unidos foi relatado até 6,0 $\mu\text{g/L}$ (para ciprofloxacino e sulfametoxazol) mesmo após o tratamento (SANSEVERINO, 2018). A revisão de PAZDA et al. (2019) por sua vez, mostra que a

presença dos mais diversos GRAs já foram detectados em estudos conduzidos com amostras de ETAs por todo o mundo (Europa, Estados Unidos, Canadá, China, Coreia e Turquia), incluindo genes de bombas de efluxo para vários fármacos, tais como β -lactâmicos, macrolídeos, quinolonas, sulfonamidas, trimetoprima e tetraciclinas.

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos (IBAMA, 2019). Em 2018, foram vendidas mais de 500.000 toneladas, sendo que 62% apresentavam Classe III de periculosidade ambiental, e 35,4% Classe II e I, representando produtos muito perigosos ao meio ambiente considerando-se a contaminação de solo, de recursos hídricos e ação em organismos não-alvo. Entre os ingredientes ativos mais comercializados estão os glifosatos, 2,4-D (diclorofenoxiacético), mancozebe, atrazina, acefato e dicloreto de paraquate (IBAMA, 2019). Tais compostos, quando em contato com o meio ambiente podem ter diferentes destinos, sendo mais desejável sua decomposição (química, microbiológica, fotodegradação), mas podendo também ocorrer sua retenção ou absorção pelo solo, plantas e outros seres vivos e mesmo seu escoamento para fontes hídricas (BAILEY; WHITE, 1970).

Muitos agrotóxicos e afins têm sido apontados como compostos que exercem pressão seletiva em microrganismos e em muitos casos, o fenômeno de resistência cruzada com antimicrobianos de uso clínico foi identificado. Esse tipo de resistência pode estar relacionado a formação de biofilme, a produção de enzimas ou aumento de expressão de genes protetores contra o estresse oxidativo, a superexpressão de bombas de efluxo, mutações ou transferência horizontal de genes de resistência a esses compostos. Trabalhos como o de KURENBACH et al. (2017) mostraram que a exposição de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* ao glifosato, dicamba e 2,4-D promoveu resistência aos antimicrobianos ciprofloxacino e canamicina. Já JE et al. (2012), embora não tenham estudado antimicrobianos, demonstraram a superexpressão de bombas de efluxo em isolados de *E. coli* não suscetíveis a glifosato, bem como de possíveis alterações em diversos transportadores de membranas, que por serem inespecíficos teriam grandes chances de promover resistência cruzada a antimicrobianos. SHIN et al. (2016), ao analisarem bactérias isoladas de pomares de frutas cítricas, encontraram que 82% dos isolados não suscetíveis a glifosato também apresentava perfil de resistência a penicilina. CAO; MOORE; HELMANN (2005) demonstraram a resistência adaptativa de *Bacillus subtilis* contra paraquate pela ativação de mecanismos adaptativos contra estresse oxidativo induzido.

Os metais pesados são assim classificados por apresentarem densidade acima de 5 g/cm³. São naturalmente encontrados em diversos meios, porém na maior parte do tempo em

concentrações muito pequenas. Mas estas podem aumentar como resultado da atividade humana e mesmo bioacumularem em componentes bióticos desses ambientes. Entre as principais fontes desses metais como contaminantes estão os rejeitos de mineração, alguns fertilizantes e efluentes industriais. Como exemplo do último caso, os efluentes gerados na dessalinização do petróleo possuem além de óleo, enxofre e compostos nitrogenados, os metais mercúrio, cádmio e chumbo (MOTTA et al., 2013; UTVIK; NORSK, 1999). Os mecanismos de resistência contra metais são muito similares aos demais compostos já mencionados, como a redução dos níveis intracelulares por meio da redução do número de porinas na superfície celular, aumento da expressão de bombas de efluxo, inativação do metal por redução convertendo-o para uma forma não tóxica, proteção contra o estresse oxidativo com reparo de moléculas por chaperonas, enzimas ou antioxidantes (SANSEVERINO et al., 2018). Já é bem elucidado, neste caso, mecanismos de resistência cruzada entre metais pesados como arsênio, mercúrio, zinco, cádmio, cobalto e cobre com os antimicrobianos cloranfenicol, tetraciclina, ciprofloxacino, rifampicina e β -lactâmicos (PAL et al., 2015; SANSEVERINO et al., 2018).

A presença de resíduos de diversos compostos com poder de exercer pressão seletiva em comunidades bacterianas, juntamente com a alta diversidade e densidade de microrganismos em ambientes aquáticos, como estações de tratamento de efluentes, torna esses ambientes propícios à seleção, proliferação e persistência de BRAs e transferência horizontal de GRAs. Por isso, estudos para melhor entender a dinâmica e consequências dessas alterações nesses ambientes são fundamentais para estabelecer melhores medidas de controle microbiológico e promover o debate acerca do agravamento da resistência bacteriana aos antimicrobianos.

2. JUSTIFICATIVA

Estamos em uma época marcada pela resistência bacteriana a antimicrobianos, crescente falta de opções terapêuticas no tratamento de infecções e preocupação com os impactos da contaminação ambiental por fármacos antimicrobianos. Embora a resistência seja natural, a ampla utilização e mau uso de antimicrobianos e outras substâncias que exercem pressão seletiva aceleram o processo de seleção de bactérias resistentes a antimicrobianos (BRAs). Grande atenção é voltada para mecanismos de aquisição de genes de resistência a antimicrobianos (GRAs) por transferência horizontal, facilitada em locais com alta densidade e riqueza de bactérias e bacteriófagos, tais como os ambientes aquáticos.

Resíduos de produtos que exercem atividade antimicrobiana podem estar presentes em efluentes domésticos, industriais e hospitalares. Por não serem completamente removidos em estações de tratamento de efluentes (ETEs), atingem rios, lagos e solos podendo alterar a estrutura das comunidades microbianas ali presentes, favorecendo o aumento de elementos do resistoma. Nesse sentido, ETEs são consideradas potenciais fontes para disseminação de resistência, uma vez que bactérias patogênicas ou não são expostas aos GRAs e à presença, em concentrações subinibitórias, de diversos antimicrobianos.

Nos últimos anos, a crise hídrica tem levado diferentes setores a buscarem estratégias para minimizar a captação de água e o descarte de efluentes em cursos hídricos. Nesse contexto, a água de reuso, resultante do tratamento de efluentes, mostra-se uma alternativa promissora. Na maioria dos casos, essas águas tratadas apresentam bactérias próprias de solo e água; porém, considerando-se que muitas fontes de água recebem direta ou indiretamente efluentes contendo dejetos humanos e animais, potenciais patógenos podem ser detectados.

De modo a minimizar os problemas associados a microrganismos, é preciso estabelecer tratamento adequado da água, utilizando biocidas capazes de impedir a proliferação e inativar células microbianas. Entre as opções disponíveis, biocidas clorados apresentam bom custo-benefício, porém busca-se alternativas mais amigáveis ao meio ambiente, ao manipulador e ao sistema industrial, uma vez que esses biocidas podem danificar as tubulações por sua ação oxidante e trazer riscos à saúde devido a produção de derivados.

Por isso, deve-se avaliar a eficiência dos atuais métodos de tratamento de efluentes, bem como caracterizar as comunidades bacterianas presentes nesses sistemas, quanto a sua diversidade, susceptibilidade a diferentes biocidas e antimicrobianos e mecanismos de resistência. É fundamental identificar reservatórios de patógenos e GRAs transferíveis, e os riscos que podem trazer para a saúde, não somente humana, como animal e ambiental.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar a presença e dispersão de bactérias resistentes a antimicrobianos de importância clínica e a biocida clorado em diferentes ambientes aquáticos de uma refinaria de petróleo.

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar e isolar bactérias aeróbias heterotróficas totais e resistentes a antimicrobianos de importância clínica presentes em amostras de água de diferentes ambientes aquáticos de uma refinaria de petróleo: lagoa de captação de água, saída do tratamento de água, efluentes da indústria, saída do tratamento secundário, saída do tratamento terciário e bacia da torre de resfriamento alimentada com efluente terciário, por método convencional dependente de cultivo.

- Identificar os isolados bacterianos por MALDI-TOF ou sequenciamento do rDNA 16S;

- Comparar o perfil de suscetibilidade das bactérias isoladas a diferentes antimicrobianos de importância clínica e ao biocida clorado.

- Avaliar a ocorrência de resistência adaptativa e resistência cruzada com biocida clorado nas amostras de bactérias de importância clínica por meio de ensaios *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

No estudo, foram amostrados seis compartimentos aquáticos de uma refinaria de petróleo, localizada no município de Betim/MG, em duas épocas. A primeira coleta foi realizada em outubro de 2018 e a segunda em junho de 2019, compreendendo uma amostragem no período de chuvas e outra no período de seca, respectivamente.

Segue a descrição dos pontos amostrais:

- O primeiro consiste em uma lagoa artificial (LI) resultante do represamento de parte do Ribeirão Sarzedo pertencente a bacia do Rio Paraopeba, utilizada para abastecimento de água na refinaria. Segundo Deliberação Normativa COPAM 10/86, a lagoa apresenta classe II de qualidade, sendo adequada para atividades humanas e consumo após tratamento convencional. Seus principais tributários são o Ribeirão Ibirité e o Córrego Pintados, ambos passando por áreas fortemente urbanizadas e industrializadas, recebendo grande quantidade de efluentes industriais e esgotos sanitários urbanos sem tratamento (YAMADA, 2010);

- O segundo consiste na saída de uma estação de tratamento de água (ETA) que trata a água bruta captada da lagoa, por processos físicos e químicos, passando por coagulação, floculação, decantação, filtração, clarificação de alta taxa e cloração;

- O terceiro se refere aos efluentes gerados na refinaria (ES), desde água usada no processamento da matéria prima até o efluente doméstico, que são destinados aos tratamentos secundário e terciário para serem convertidos em água de reuso;

- O quarto é a saída do tratamento secundário (SS), constituído por um tratamento biológico que inclui uma lagoa aerada de mistura completa e uma lagoa facultativa, com posterior passagem por biodisco;

- O quinto é a saída do tratamento terciário (ST), constituído por processos físico-químicos como cloração, clarificação de alta taxa, passagem em filtros de areia e de carvão ativado granular, visando a remoção de sólidos, compostos orgânicos e sais dissolvidos;

- O sexto consiste na bacia de coleta da água resfriada da torre de resfriamento (BT) alimentada pela água de reuso.

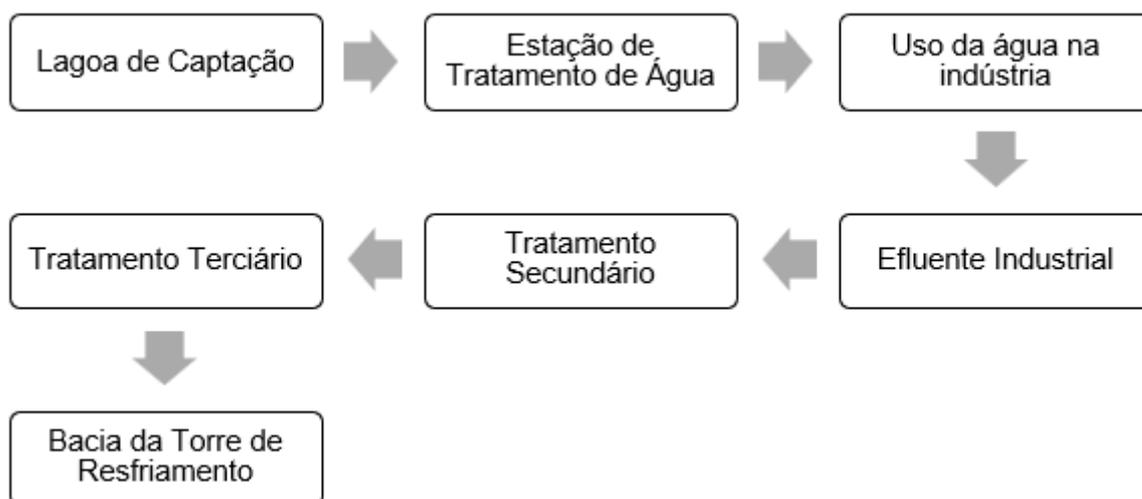


Figura 1: Fluxograma indicando o fluxo de captação, uso e tratamento de água dos pontos coletados.

4.2. Coleta e processamento de amostras

Foram coletadas duplicatas de cada ponto amostral, sendo na ETA 5L de água, em galões estéreis de polietileno de alta densidade e nos demais locais demarcados, 1L de água em frascos âmbar estéreis, todos contendo 0,1% de tiosulfato de sódio (para neutralizar a ação do cloro residual). As amostras foram enviadas e prontamente processadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada – UFMG. Para cada amostra, membranas de nitrocelulose de 0,22 µm de diâmetro de poro foram armazenadas em frascos estéreis a – 20 °C após filtragem de 300 mL de água.

4.3. Quantificação e isolamento de bactérias heterotróficas totais por técnica *spread plate*

Para a quantificação e isolamento de BHT, alíquotas de 100 µL das amostras originais e de suas diluições foram inoculadas na superfície de placas contendo o meio Reasoner's 2A sólido (R2A - HIMEDIA) pelo método de *spread plate*, com exceção das amostras da ETA. Das quais 5L foram filtrados em membranas de nitrocelulose de 0,22 µm de diâmetro de poro e depositadas na superfície de meio R2A, devido à baixa densidade de bactérias presentes neste ambiente.

Todas as placas foram incubadas a 30° C por até 72 horas. Após o período de incubação, foi realizada a quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Representantes de diferentes morfotipos foram submetidos a coloração diferencial de Gram e caracterizados quanto às características morfotintórias. As colônias foram purificadas no meio R2A. Amostras das culturas puras obtidas foram armazenadas em criotubos, contendo caldo nutriente acrescido de 20% de glicerol, em temperatura de - 20 °C.

4.4. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes a antimicrobianos de importância clínica pela técnica de número mais provável (NMP).

As amostras foram diluídas serialmente em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e usadas nos ensaios de determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais (BHT) e resistentes a antimicrobianos (BRAs) utilizando o método do NMP em microplacas de 96 poços, seguindo a metodologia de BINET; PORTAL; LEYVAL (2011), com modificações. Alíquotas de 20µL de diferentes diluições (entre 10⁰ a 10⁻⁷) foram inoculadas nos poços da microplaca contendo 200 µL de meio líquido *Mueller Hinton* (Difco), sendo realizadas seis repetições para cada diluição. Para BRAs, o meio líquido *Mueller Hinton* foi adicionado dos antimicrobianos de interesse, descritos na **Tabela 1**. Foram estabelecidas concentrações consideradas altas para *Enterobacterales*, *Acinetobacter* sp., não-*Enterobacterales* sp. e *Staphylococcus* sp. conforme valores de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018) e metodologia baseada em PANG et al. (2015).

Tabela 1: Antimicrobianos e concentrações utilizadas para NMP

Antimicrobiano	Concentração (mg/L)	Grupo de referência
Ampicilina	32	<i>Enterobacterales</i>
Ciprofloxacino	4	<i>Enterobacterales</i> , não- <i>Enterobacterales</i> , <i>Acinetobacter</i> sp. e <i>Staphylococcus</i> sp.
Ceftriaxona	4	<i>Enterobacterales</i>
Eritromicina	8	<i>Staphylococcus</i> sp.
Tetraciclina	16	<i>Enterobacterales</i> , não- <i>Enterobacterales</i> , <i>Acinetobacter</i> sp. e <i>Staphylococcus</i> sp.

Após adição de 20 µL de cada diluição da suspensão celular em seis repetições, as placas foram vedadas e incubadas a 37 °C. Após 24 h, o crescimento foi avaliado por meio de observação visual da turvação nos poços. Os poços foram adicionados de 50 µL da solução

aquosa do indicador redox 2, 3, 5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) na concentração de 3g/L e incubados por 1h para confirmar a leitura visual. Foram considerados positivos os poços de cada diluição, que apresentaram turvação e/ou coloração rosa da redução do indicador de viabilidade, sendo comparados com os controles negativos que consistem do meio de cultura suplementado e não suplementado com antimicrobianos, mas sem adição do inóculo.

Após a determinação do número de poços positivos e negativos, para cada diluição, em ambos os ensaios, o cálculo do NMP/mL foi realizado com a utilização do software da Microsoft Excel, associado a uma equação descrita por BRIONES; REICHARDT (1999), conforme ilustrado em **Figura 2**, na qual a é o volume inoculado no poço, p , o número de poços positivos, e n , o número de poços inoculados.

$$\frac{a_1 p_1}{1 - e^{-a_1 x}} + \frac{a_2 p_2}{1 - e^{-a_2 x}} + \frac{a_3 p_3}{1 - e^{-a_3 x}} = a_1 n_1 + a_2 n_2 + a_3 n_3$$

Figura 2 Equação para determinar NMP/mL (BRIONES; REICHARDT, 1999).

4.5. Pesquisa de *Legionella* spp.

Uma alíquota de cada amostra de água foi concentrada por filtração e tratada com calor (30 minutos a 50°C). Em ágar Legionella (Acumedia) adicionado de L-cisteína (4%) e pirofosfato férrico (2,5%), 100 µL das amostras, em triplicata, foram semeadas por método *spread plate* e incubadas de 7 a 10 dias a 37°C. *L. pneumophila* produz colônias pequenas a grandes, regulares, incolores a pálidas, cinza-azuladas, levemente mucoides, que fluorescem verde-amarelado sob luz UV com comprimento de 365 nm.

4.6. Identificação das bactérias

As bactérias isoladas foram identificadas com espectrometria de massa por ionização e desorção a laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI-ToF/MS). Os isolados que não identificados por MALDI-ToF foram submetidos ao sequenciamento do rDNA 16S.

4.6.1. Identificação por MALDI-TOF/MS

As bactérias foram cultivadas durante 24h a 37 °C em ágar nutriente e enviadas para o Laboratório AQUACEN – Escola de Veterinária, UFMG, para identificação.

Na técnica, as colônias são raspadas usando alça de sementeira estéril e aplicadas como uma película fina em uma placa de aço de 24 pontos (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A amostra seca ao ar é tratada com 1 µL de solução saturada da matriz de ácido a-ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics) em 50% de acetonitrila/ácido trifluoroacético 2,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os espectros de massa são adquiridos em modo refletor-positivo no instrumento MicroFlex LT (Bruker Daltonics), usando as configurações padrão do fabricante. Os espectros capturados são analisados usando o software MALDI Biotyper automation 2.0 (Bruker Daltonics). Os critérios de identificação utilizados na análise foram: uma pontuação ≥ 2.000 indica identificação em nível de espécie, pontuação de 1.700-1.999 indica o nível do gênero, e uma pontuação <1.700 foi interpretada como não identificada. Linhagens de referência foram utilizadas como controle positivo para a análise.

4.6.2. Identificação molecular por sequenciamento do rDNA 16S

4.6.2.1. Extração de DNA dos isolados

Os isolados foram cultivados em ágar nutriente por 18h a 37°C. O procedimento de extração de DNA foi adaptado (DOYLE, 1991), consistindo na ressuspensão de células removidas das colônias das placas em 200 µL de TE (Tris HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM) seguido de centrifugação a 6.000 g por 5 min, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* foi ressuscitado em 600 µL de solução CTAB (100 mM Tris-HCl, 1,4 M cloreto de sódio, 20 mM EDTA, 0,1% β -mercaptoetanol e 2% CTAB) com 40 µL de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1) e submetido por 30 min a 65°C, com agitação em vórtex a cada 15 min. Após esse período, 600 µL de CIA foi adicionado aos tubos. Após a homogeneização da mistura, os tubos foram centrifugados a 16.000 g por 10 min e a fase aquosa transferida para tubos novos, nos quais foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram incubados por cerca de 12h a -20 °C e centrifugados a 16.000 g por 10 min, para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com etanol 70%. Após evaporação do etanol, os *pellets* foram ressuscitados em 50

μL de TE e estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%, e a concentração determinada em espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 a 260 nm e 280 nm.

4.6.2.2. Amplificação por PCR do rDNA 16s

A amplificação da região do rDNA 16S foi realizada com *primers* universais para bactérias 27F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') e 806R (5'- GCG GAT CCG CCG CCG CGG ACT ACC AGG GTA TCT AAT -3') ou 8F (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3') e 907R (5' - CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT -3'). A reação de 50 μL foi constituída de 5 μL de Tampão (10X), 4 μL de MgCl_2 (25mM), 1,5 μL de dNTP (10 mmol μL^{-1}), 2,5 μL de cada *primer* (10 pmol μL^{-1}), 0,3 μL de Taq DNA polimerase (5U μL^{-1}) e 2 μL de DNA (90-120 ng μL^{-1}).

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada utilizando o termociclador (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 5 min a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 26 ciclos de 1 min a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min a $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, finalizado por 5 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. O produto da PCR foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm e a integridade do fragmento analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado por brometo de etídeo, com a utilização de padrão de peso molecular de 1Kb (DNA ladder - Promega).

4.6.2.3. Purificação e sequenciamento

Para purificação dos produtos de PCR, foram adicionados aos tubos 11,25 μL de EDTA (125 mmol L^{-1}) e 135 μL de etanol absoluto. A mistura foi incubada por 15 min à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 16.000 g por 25 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para precipitação dos amplicons. O sobrenadante foi descartado e aos tubos foram adicionados 120 μL de etanol 70% (v/v). Os mesmos foram homogeneizados por inversão, centrifugados a 16.000 g por 10 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante novamente descartado. Após total evaporação do etanol residual o produto foi ressuscitado em 10 μL de água livre de nuclease. O produto obtido foi quantificado em Nanodrop™ 1000 a 260 nm.

A seguir, foram feitas reações de sequenciamento das amostras com *primers* senso e antissenso e kit BigDye™ Terminator v3.1. Cada reação continha: 0,8 μL de BigDye, 1,6 μL de tampão do kit, 1 μL do *primer* correspondente (27F, 8F, 806R ou 907R) a 5 μM , 1,4 μL

do DNA purificado (12 ng/ μ L) e completado com água para 10 μ L. A reação de PCR deu-se com ciclo de *step down*, conforme quadro a seguir:

Quadro 1: Ciclagem para reação de PCR

Passos do ciclo	Temperatura	Tempo (min:seg)
1	96 °C	01:00
2	96 °C	00:15
	Rampa 1°C/seg \pm 0,0 °C/seg	
3	50 °C	00:15
4	60 °C	0:00
5	Ir para passo 2, repetir 34 vezes	
6	4 °C	∞

Os produtos de sequenciamento obtidos foram novamente purificados e precipitados conforme já descrito. Ao final, foram secos e enviados para análise em sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) no Instituto René Rachou (FIOCRUZ - MINAS). As sequências obtidas tiveram a qualidade conferida com a ferramenta *Electropherogram quality analysis*, disponibilizada em (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br>) e foram analisadas pelo programa Geneious - *Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis*. Sempre que possível, as sequências geradas pelos *primers* senso e antissenso foram alinhadas para gerar sequências consenso, que foram comparadas com sequências gênicas de rDNA depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o servidor Blast do National Centre for Biotechnology Information - NCBI. Para ser pertencente a uma determinada espécie, utilizou-se identidade de pelo menos 97% com outra já depositada no GenBank. Sequências que não apresentaram identificação foram editadas, retirando-se as sequências de baixa qualidade, e comparadas no banco de dados. Isolados com similaridade de sequência abaixo de 97%, mas acima de 90% foram identificados em nível de gênero.

4.7. Testes de suscetibilidade

4.7.1. Método de disco difusão

Para avaliação da susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos foi usado o método de disco difusão, conforme parâmetros definidos pelo documento M02-A13 (CLSI, 2019).

Os antimicrobianos foram selecionados para cada grupo bacteriano conforme sugestões de antimicrobianos para teste primário, disponível no documento M100 (CLSI, 2020). Utilizou-se os parâmetros do EUCAST (2019) para *Pseudomonas* sp. e *Aeromonas* sp.

- *Staphylococcus* sp.: eritromicina, clindamicina, oxacilina (disco de cefoxitina), tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacino, cloranfenicol e sulfazotrim;

- *Enterococcus* sp.: eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacino, cloranfenicol e vancomicina;

- *Enterobacterales*: ceftriaxona, ciprofloxacino, gentamicina, imipenem, sulfazotrim e cloranfenicol;

- *Aeromonas* sp.: ceftazidima, ciprofloxacino e sulfazotrim;

- *Acinetobacter* sp.: ciprofloxacino, gentamicina, imipenem, sulfazotrim e ceftazidima;

- *Pseudomonas* sp.: ceftazidima, ciprofloxacino, gentamicina e imipenem.

O inóculo foi ajustado para o padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL) e com um *swab* estéril, distribuído uniformemente em ágar *Mueller Hinton*. Os discos antimicrobianos foram depositados sobre o ágar e a placa incubada a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, o halo de inibição foi medido em milímetros (mm). Cepas padrões de *E. coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram usadas como controle para validação do método.

4.7.2. Método de microdiluição de antimicrobianos

O procedimento foi realizado conforme o documento M07-A11 (CLSI, 2018). Os *breakpoints* utilizados para caracterização do perfil de suscetibilidade dos isolados dos grupos *Acinetobacter* sp., *Enterobacterales*, *Stenotrophomonas* sp. e *Pseudomonas* sp. foram definidos conforme documento M100 (CLSI, 2020), para *Aeromonas* sp. utilizou-se os parâmetros EUCAST (2019). Para bactérias sem valores de referência, foi definido apenas o valor de CIM, sem associar com perfil suscetível ou resistente. Em placas de 96 poços com fundo em U, realizou-se a microdiluição seriada de cada antimicrobiano duas vezes mais concentrados do que o valor final desejado. O inóculo foi feito a partir de culturas jovens dos isolados, sendo ajustado em solução salina para o padrão 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL) e diluído em caldo na proporção de 1:200 para que a concentração de células ficasse entre 5×10^4 e 5×10^5 UFC/mL. Às placas já preparadas com antimicrobianos, adicionou-se o mesmo volume do inóculo e após vedação, foram incubadas a 37 °C por 24

h. Cepas padrões de *E. coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foram usadas como controle para validação do método. A leitura foi realizada visualmente olhando-se a placa pelo fundo contra uma fonte de luz, considerando-se a concentração do primeiro poço límpido na placa como a CIM, ou seja, a concentração inibitória mínima de antimicrobiano ($\mu\text{g/mL}$) capaz de inibir o crescimento bacteriano.

4.7.3. Método de microdiluição de hipoclorito de sódio

Os inóculos foram preparados a partir de culturas jovens dos isolados, ajustados em solução salina para o padrão 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL) e adicionados (quantidade de 10% do volume final no poço) em duplicata nas placas de 96 poços.

A solução de hipoclorito de sódio foi titulada por método iodométrico para determinação da concentração de cloro livre e diluída serialmente em tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) para obtenção de sete concentrações variando de 100 mg/L até 1,56 mg/L. As diluições, bem como um controle contendo somente o tampão, foram depositadas nas placas já adicionadas do inóculo. Usou-se o tampão ao invés de meio de cultura para minimizar a perda de cloro associada a oxidação de compostos orgânicos presentes no meio de cultura. Após incubação por 3h a temperatura ambiente para ação do cloro, as placas foram adicionadas de caldo nutriente acrescido de tiosulfato de sódio para neutralização dos resíduos de cloro e novamente incubadas por até 24h a 37°C. A leitura foi realizada visualmente olhando-se a placa pelo fundo contra uma fonte de luz, considerando-se o primeiro poço límpido na placa representante da menor concentração de cloro capaz de inibir o crescimento bacteriano.

4.7.4. Ensaios com diferentes tempos de exposição e concentrações de cloro

Os ensaios foram conduzidos para comparar a viabilidade e crescimento de pares de bactérias com perfis suscetíveis ou não a antimicrobianos (teste de disco difusão) frente a diferentes exposições a tempo/concentração de cloro livre (**Tabela 2**).

Foram testadas as concentrações de cloro 0,2, 2, 20 e 200mg/L, juntamente com um controle da viabilidade dos isolados contendo tampão PBS (pH 7,4) sem adição do biocida. Os ensaios foram conduzidos em tubos contendo tampão PBS adicionados de inóculo padronizado na escala 0,5 de McFarland. Nos tempos de 15min, 1h, 3h, 6h, 9h e 24h de

incubação a temperatura ambiente, alíquotas de 100 µL foram removidas e diluídas serialmente em microtubos contendo 900 µL de solução salina (0,85% NaCl), seguido do plaqueamento em triplicata de 10 µL por técnica de micro-gota para determinação da densidade celular expressa em UFC/mL. As médias dos resultados obtidos foram comparados em relação ao controle sem biocida e expressos como porcentagem de viabilidade.

Tabela 2: Isolados utilizados para teste de exposição ao cloro

ID	Identificação	Perfil de suscetibilidade
M115	<i>Acinetobacter tandoii</i>	Resistente a IMI, CIP e SUT
M110	<i>Acinetobacter tandoii</i>	Suscetível a GEN, IMI, CIP, CAZ e SUT
M108	<i>Bacillus cereus</i>	*
M87	<i>Bacillus cereus</i>	*
M101	<i>Pseudomonas</i> sp.	Resistente a IMI, CIP e CAZ
M104	<i>Pseudomonas</i> sp.	Suscetível a GEN, IMI, CIP e CAZ
M55	<i>Serratia marcescens</i>	Resistente a CIP, SUT, IMI e CRO
M95	<i>Serratia marcescens</i>	Suscetível a GEN, IMI, CIP, CRO, SUT e CLO

IMI: imipenem; CIP: ciprofloxacino; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; SUT: sulfazotrim; CLO: cloranfenicol.

*sem valores de referência, porém em relação ao isolado M87, o isolado M108 apresentou menores halos de inibição e maior CIM para os antimicrobianos testados.

4.8. Ensaios de resistência adaptativa

Os ensaios de resistência adaptativa foram realizados submetendo os isolados de interesse clínico ao cultivo em concentrações crescentes do biocida clorado, segundo o método proposto por OZ et al. (2014), com modificações. Para o teste, o inóculo foi padronizado na escala 0,5 de McFarland. A seguir, alíquotas de 50 µL foram transferidas para o primeiro tubo contendo 500 µL de tampão PBS com uma dose sub-CIM (0,78 mg/L) do biocida. Após 2 h de incubação, acrescentou-se 500 µL de caldo *Müller Hinton*. Após incubação *overnight* a 37°C, o procedimento foi repetido dobrando a concentração do biocida a cada passagem até que o isolado não apresentasse mais turvação após incubação. Nas últimas passagens, uma alíquota de cada amostra era retirada e plaqueada em ágar *Müller Hinton* para verificar presença de células viáveis. As bactérias selecionadas foram cultivadas em ágar McConkey antes e após a execução do ensaio, baseando-se em características de

morfologia de colônia e fermentação da lactose garantiu-se que o isolado adaptado não se tratasse de contaminação.

4.9. Resistência cruzada

Para avaliar se a resistência adaptativa resultou em resistência cruzada aos antimicrobianos, o ensaio de microdiluição foi realizado novamente para as populações adaptadas obtidas, comparando-se com o perfil de suscetibilidade das linhagens selvagens.

4.10. Análises estatísticas e de similaridade

A variação de densidade entre as coletas e entre os pontos foi analisada estatisticamente pela análise de variância (Anova), seguida por teste de Scott-Knott com nível de confiança de 95%. Esses testes foram utilizados para avaliar as diferenças entre os pontos e coletas em relação a suscetibilidade ao cloro, com auxílio do programa Sisvar, versão 5.6.

Para avaliar a similaridade entre os pontos quanto a variação de gêneros bacterianos encontrados utilizou-se o índice de Jaccard, dado pela divisão do número total de indivíduos distintos encontrados em um ponto pela soma do número total de indivíduos distintos e do número de indivíduos exclusivos no primeiro e no segundo ponto. Desse modo, o índice de Jaccard considera apenas a presença ou ausência de gêneros ou espécies, sem considerar sua abundância. Na análise, valores iguais a um representam amostras idênticas, e valores iguais a zero, amostras totalmente distintas. Utilizou-se o software Past, versão 2.17.

Para verificar correlação entre suscetibilidade a antimicrobianos e cloro, utilizou-se o coeficiente de Pearson com intervalo de confiança de 95%, que mede a correlação (positiva ou negativa) linear entre duas variáveis. Para tanto, utilizou-se o software MiniTab 19.

5. RESULTADOS

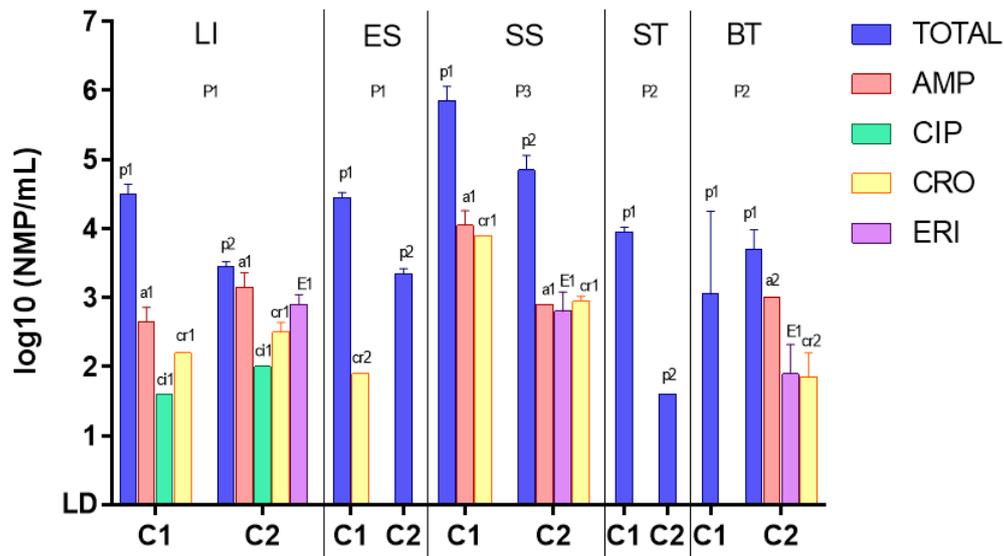
5.1. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes a antimicrobianos de importância clínica pela técnica de número mais provável (NMP).

A densidade de BHT variou de forma significativa ($p < 0,05$) com a época de coleta e os pontos amostrados (**Anexo B**). A densidade bacteriana na primeira e segunda coleta foi: $3,4 \cdot 10^4$ NMP/mL contra $2,9 \cdot 10^3$ NMP/mL na lagoa de captação (LI); $2,9 \cdot 10^4$ NMP/mL e $2,2 \cdot 10^3$ NMP/mL no efluente antes do tratamento biológico (ES); $7,9 \cdot 10^5$ NMP/mL e $7,9 \cdot 10^4$ NMP/mL após o tratamento biológico (SS); $8,5 \cdot 10^3$ NMP/mL e 41 NMP/mL após tratamento físico-químico (ST); $3,8 \cdot 10^3$ NMP/mL e $5,6 \cdot 10^3$ NMP/mL na bacia da torre (BT) (**ANEXO A**). Para efeito de melhor visualização, esses dados foram convertidos para escala logarítmica e conforme representado na **Figura 3**, as maiores densidades de BHT foram observadas para os pontos SS, LI e ES, com variação de uma unidade logarítmica (10 vezes maior na primeira coleta) entre as coletas. O ponto que apresentou maior variação foi ST, com redução de duas unidades logarítmicas na segunda coleta. BT, foi o único ponto que apresentou maior valor na segunda coleta, sendo a primeira 0,7 vezes menor. Em ambas as coletas, não houve detecção de bactérias na amostra da estação de tratamento de água (ETA).

Quanto a densidade de bactérias resistentes às concentrações altas de antimicrobianos, as populações bacterianas na presença de CIP e ERI não apresentaram diferença significativa entre os pontos amostrados, enquanto na presença de AMP e CRO não diferiram entre as épocas ($p > 0,05$) (**ANEXO C**) (**Figura 3**). Não foi detectado a presença de resistentes a tetraciclina por essa técnica, embora nos testes posteriores, isolados de todos os pontos, com exceção de ST, apresentaram resistência a esse antimicrobiano. Os pontos LI e SS apresentaram as maiores densidades de bactérias na presença dos antimicrobianos. Considerando os valores em NMP/mL, LI apresentou o maior percentual de bactérias presentes mesmo em alta concentração dos antimicrobianos, em relação a densidade total de bactéria, na primeira e segunda coleta, respectivamente, foram 1,3% e 53,9% com ampicilina (AMP), 0,4% e 12% com ceftriaxona (CRO). Este foi o único ponto a apresentar bactérias na presença de ciprofloxacino (CIP) com valores de 0,1% e 3,1% na primeira e segunda coleta, respectivamente. O segundo maior valor se deu para SS com 1,5% e 1% com AMP e 1% e 1,1% com CRO. Apenas na segunda coleta, foi observado crescimento bacteriano com eritromicina (ERI), 28,4% em LI, 1,7% em BT e 0,9% em SS. BT também apresentou 1,6% com CRO, apenas na segunda coleta. ES apresentou bactérias na presença dos antimicrobianos somente na primeira coleta com CRO, correspondendo a 0,3% das bactérias

totais, enquanto ST não apresentou positividade na presença de nenhum antimicrobiano por essa técnica (**ANEXO A**).

Figura 3 Densidades de bactérias heterotróficas totais e na presença de diferentes antimicrobianos nas amostras avaliadas pela técnica de NMP, representadas em \log_{10} (NMP/mL). Pontos amostrados: Lagoa de captação (LI), efluente industrial (ES), saída do tratamento secundário (SS), saída do tratamento terciário (ST), bacia da torre de resfriamento (BT). Coletas em diferentes épocas: C1 e C2. LD: limite de detecção da técnica (<5 NMP/mL). AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacino, CRO: ceftriaxona, ERI: eritromicina. Agrupamento por Scott-Knott ($p < 0,05$): P compara médias de BHT entre pontos amostrais; t compara médias de BHT entre as épocas dentro de cada ponto; a e cr comparam médias entre os pontos amostrais e épocas para AMP e CRO, respectivamente;



E e CI comparam médias nas diferentes épocas e pontos amostrais para ERI e CIP, respectivamente. Números iguais indicam que as densidades não diferem significativamente.

5.2. Isolamento e identificação das bactérias presentes nas amostras.

De modo geral, a densidade bacteriana utilizando a técnica de plaqueamento apresentou padrão similar ao observado pela técnica de NMP, mas com maiores valores para a maioria dos pontos amostrados (**Figura 4**). Deve-se destacar que a técnica de NMP utilizou meio de cultura rico (*Muller Hinton*) e 24h de incubação a 37°C, enquanto a técnica de plaqueamento utilizou meio pobre (R2A) com até 72h de incubação a 30°C, possibilitando multiplicação de diferentes bactérias, inclusive daquelas com perfil de divisão mais lento ou injuriadas.

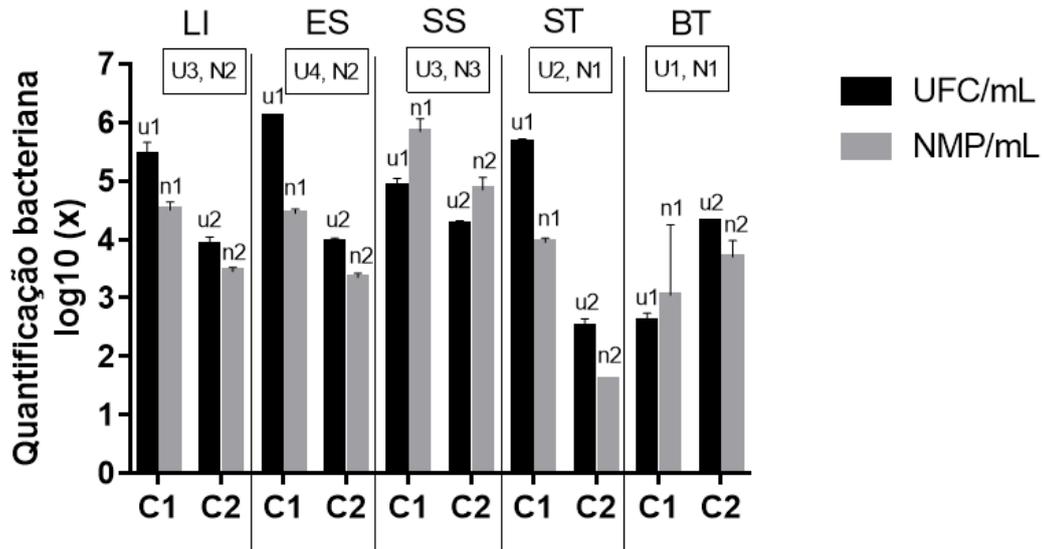


Figura 4 Comparação de densidades bacterianas obtidas pelas técnicas de número mais provável (NMP/mL) e plaqueamento (UFC/mL), expressos em log. Pontos amostrados: Lagoa de captação (LI), efluente industrial (ES), saída do tratamento secundário (SS), saída do tratamento terciário (ST), bacia da torre de resfriamento (BT). Coletas em diferentes épocas: C1 e C2. Agrupamento por Scott-Knott ($p < 0,05$): U e N maiúsculos, seguidos por mesmos números, representam pontos amostrais com densidades semelhantes, enquanto os minúsculos seguidos de números diferentes representam médias diferentes entre as épocas, para UFC/mL e NMP/mL, respectivamente.

A partir do plaqueamento de alíquotas das amostras diluídas, foram obtidos um total de 245 isolados, sendo 79% caracterizados como Gram negativos e 21% como Gram positivos.

Na primeira coleta, 22 isolados foram obtidos de LI, 20 de ES, 33 de SS, 34 de ST e 12 de BT. Na segunda coleta, 57 isolados foram de LI, 10 de ES, 25 de SS, 8 de ST e 24 de BT. O critério de isolamento visava selecionar diferentes morfotipos, de modo que amostras com maior diversidade acabaram com mais isolados mesmo não apresentando a maior densidade. Isto é observado mais precisamente em ES que apresentou grande densidade bacteriana, mas poucos isolados e em LI que apresentou menor densidade bacteriana e uma grande quantidade de isolados, especialmente na segunda coleta.

Os isolados identificados (cerca de 80%, $n = 195$) foram atribuídos a 78 espécies, 38 gêneros, 24 famílias, 16 ordens, 7 classes e 5 filos (**Anexo D**).

Todos os pontos, nas duas coletas, apresentaram no mínimo 30% dos isolados como pertencentes ao filo *Proteobacteria*, sendo este predominante na maioria (média de 60%), com exceção de BT na primeira coleta e ES e ST na segunda coleta, que apresentaram predominância do Filo *Firmicutes* (cerca de 50% dos isolados) (**Figura 5**). O terceiro filo mais abundante foi *Bacteroidetes*, especialmente nas amostras de SS, porém sendo ausente

em BT na primeira coleta e em ES e ST na segunda coleta. Quando analisados todos os pontos e coletas em conjunto, essa mesma relação geral se mantém, como ilustrado na **Figura 6**.

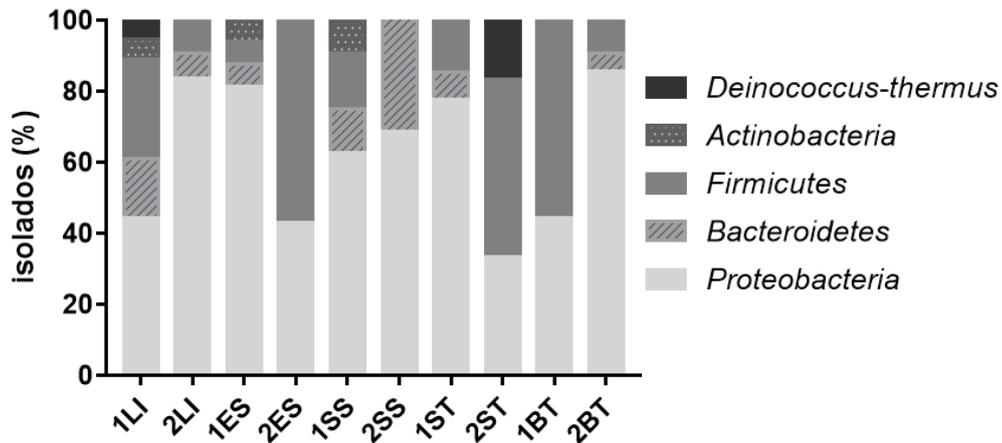


Figura 5 Proporção entre Filos de cada ponto amostrado: Lagoa de captação (LI), efluente industrial (ES), saída do tratamento secundário (SS), saída do tratamento terciário (ST), bacia da torre de resfriamento (BT). Os prefixos 1 e 2 indicam coletas em diferentes tempos.

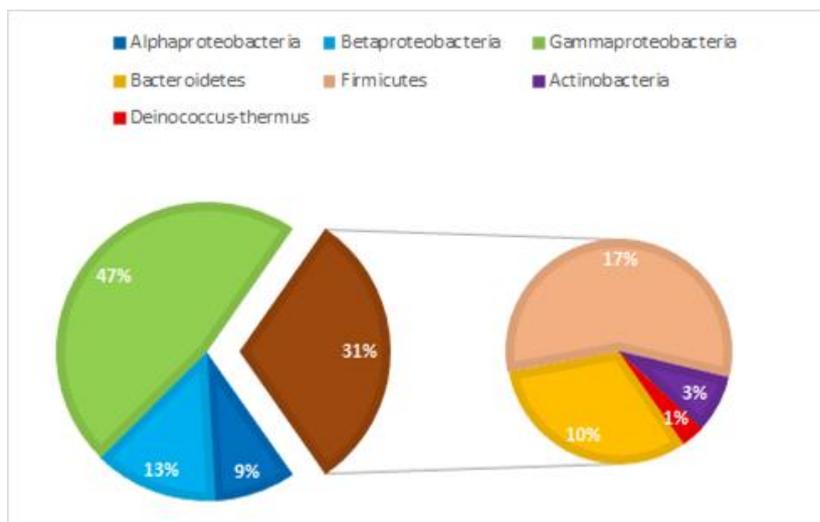
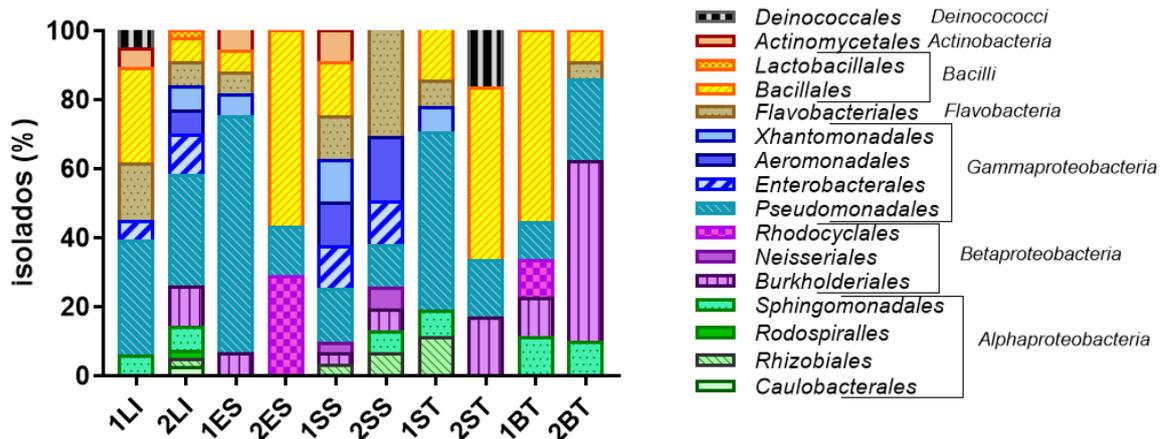


Figura 6 Composição total das bactérias isoladas. A esquerda, Classes de *Proteobacteria*; a direita, demais Filos.

Observando-se em nível de classe, *Gammaproteobacteria* foi presente em todos os pontos, sendo em maioria a classe prevalente. Em seguida, temos *Bacilli*, presente em todas as amostras com exceção de SS na segunda coleta, e *Flavobacteria*, ausente somente em BT na primeira coleta e em ES e ST na segunda coleta. Com relação as ordens, se destacam em número absoluto: *Pseudomonadales* (n=60, dos quais 53% são *Pseudomonas* sp. e 47%, *Acinetobacter* sp.), *Bacillales* (n=33, 75% *Bacillus* sp.), *Burkholderiales* (n=21, 76% *Acidovorax* sp.), *Flavobacteriales* (n=19, 73% *Chryseobacterium* sp.) e *Enterobacterales* (n=12, 50% *Serratia* sp.). *Aeromonadales*, *Sphingomonadales* e *Xhantomonadales* vêm em sequência, com 10 isolados cada. Cada ponto amostral possui um perfil de comunidade

distinto além de apresentar variações sazonais na ocorrência de representantes destas ordens e gêneros. Em LI é notável a maior variedade de bactérias, mesmo considerando-se apenas em nível de ordem, com semelhanças entre as coletas, mas com maior complexidade na segunda coleta; em SS e BT a composição geral permanece nas duas coletas, com variação apenas nas quantidades (**Figura 7**).

Figura 7 Proporção entre Ordens dos isolados de cada ponto amostral: Lagoa de captação (LI), efluente industrial (ES), saída do tratamento secundário (SS), saída do tratamento terciário (ST), bacia da torre de



resfriamento (BT). Os prefixos 1 e 2 indicam coletas em diferentes tempos. Na legenda, à direita, as Ordens são agrupadas em suas respectivas Classes.

A análise de agrupamento das amostras usando o índice de similaridade de Jaccard (**Figura 8**) confirma que as comunidades bacterianas das amostras de SS e BT apresentam maior similaridade entre as épocas analisadas, respectivamente 35% e 40%. LI apresenta menor similaridade (25%), enquanto os pontos ES e ST se distanciam. Ademais, além de SS e BT que se agrupam, nota-se que 1ES e 1ST apresentam similaridade de 55% entre si e tendem a se agrupar com LI, enquanto 2ST apresenta similaridade (cerca de 20%) com BT. Esta diferença de padrão está associada as diferentes características físico-químicas particulares de cada ponto amostral, as quais podem variar com o tempo e parâmetros operacionais.

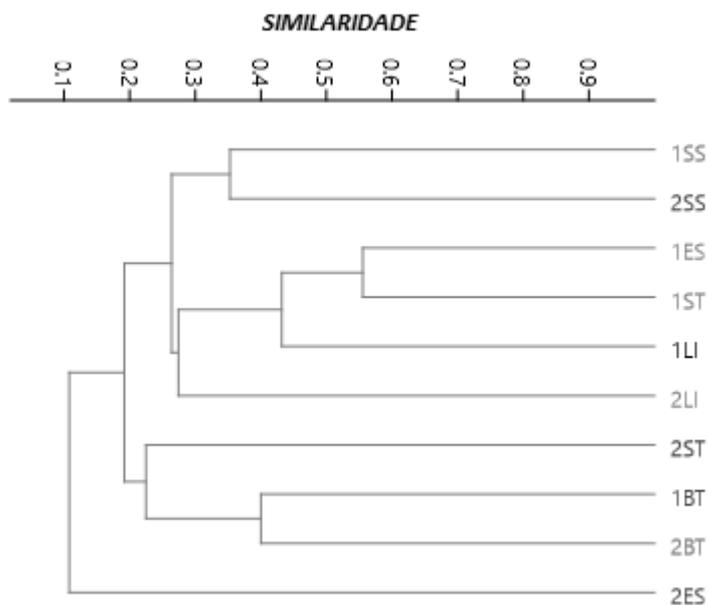


Figura 8 Dendrograma de Similaridade de gêneros entre pontos amostrais baseado no índice de Jaccard

Dos 38 gêneros identificados, cinco foram atribuídos a 58% das 195 bactérias identificadas, sendo eles *Pseudomonas* sp. (16%), *Acinetobacter* sp. (14%), *Bacillus* sp (13%), *Acidovorax* sp. (8%) e *Chryseobacterium* sp. (7%). Destaca-se que metade de *Acinetobacter* sp. foi isolada de LI e quase metade de *Pseudomonas* sp. foi isolada de ST. Nos demais pontos, a quantidade de isolados ficou melhor distribuída por gênero. A identificação dos isolados e seus respectivos locais de origem podem ser consultados no **Anexo E**.

Os gêneros comuns entre as duas coletas foram: *Acinetobacter* sp., *Chryseobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Bacillus* sp. em LI; *Acinetobacter* sp. em ES; *Acinetobacter* sp., *Chryseobacterium* sp., *Elizabethkingia* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., e *Aeromonas* sp. em SS; *Acinetobacter* sp. e *Bacillus* sp. em ST e *Acidovorax* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp. em BT.

Desconsiderando sazonalidade, *Chryseobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. foram comuns a todos os pontos amostrados, enquanto *Acinetobacter* sp. e *Stenotrophomonas maltophilia* foram presentes em todos os pontos com exceção da bacia da torre.

LI, além de apresentar o maior número de gêneros distintos, também apresentou a maior quantidade de gêneros exclusivos, sendo eles: *Enterobacter* sp., *Nocardioides* sp., *Brevundimonas* sp., *Azospirillum* sp., *Novosphingobium* sp., *Sphingobium* sp., *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Morganella* sp. e *Enterococcus* sp. O segundo ponto com mais isolados

exclusivos foi SS com *Elizabethkingia* sp., *Ochrobactrum* sp., *Serratia* sp., *Silvimonas* sp., *Leucobacter* sp., *Delftia* sp., *Sphingobacterium* sp. e *Chromobacterium* sp. Em BT, os gêneros exclusivos foram *Staphylococcus* sp., *Ralstonia* sp. e *Sphingopyxis* sp. Os gêneros *Ensifer* sp. e *Micrococcus* sp. foram exclusivos de ST e ES, respectivamente.

O gênero *Legionella* sp. não foi identificado pelo método de plaqueamento.

5.3. Testes de suscetibilidade a antimicrobianos e cloro

5.3.1. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de disco difusão

Dos 80 isolados testados, 30 (37,5%) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados; 32 (40%) apresentaram resistência a apenas um antimicrobiano, 12 (15%) a dois antimicrobianos diferentes e 6 (7,5%) a três ou mais (**Anexo F**), sendo uma *Serratia marcescens*, um *Acinetobacter tandoii* e quatro *Pseudomonas* sp. Dos isolados resistentes a múltiplos antimicrobianos metade foi proveniente do ponto SS.

Foram identificados e testados apenas três cocos Gram positivos. Dois *Staphylococcus* sp. de BT, um apresentando resistência a ciprofloxacino e um *Enterococcus faecium* isolado de LI, com perfil resistente a eritromicina e intermediário a ciprofloxacino. A todos os demais antimicrobianos testados, esses isolados apresentaram perfil suscetível (**Anexo F**).

Para bactérias Gram negativas (*Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. e *Enterobacteriales*) percebe-se que o ponto LI apresenta isolados resistentes a cinco dos antimicrobianos testados (exceto gentamicina), porém após os processos de tratamento da água há um aumento na porcentagem de isolados resistentes, sendo que em SS há isolados resistentes a todos os antimicrobianos testados e em maior proporção. Destaca-se o aumento na porcentagem de isolados resistentes em SS e ST, em especial os resistentes a imipenem e ciprofloxacino. A resistência a ceftriaxona ou ceftazidima ocorreu em todos os pontos amostrados, com alta frequência. Cada ponto apresenta um perfil de suscetibilidade bastante distinto, e embora haja tendência de redução na suscetibilidade após o tratamento biológico, em BT foram identificados apenas alguns resistentes a ceftriaxona, sendo a maior parte dos isolados suscetíveis aos antimicrobianos testados (**Figura 10**).

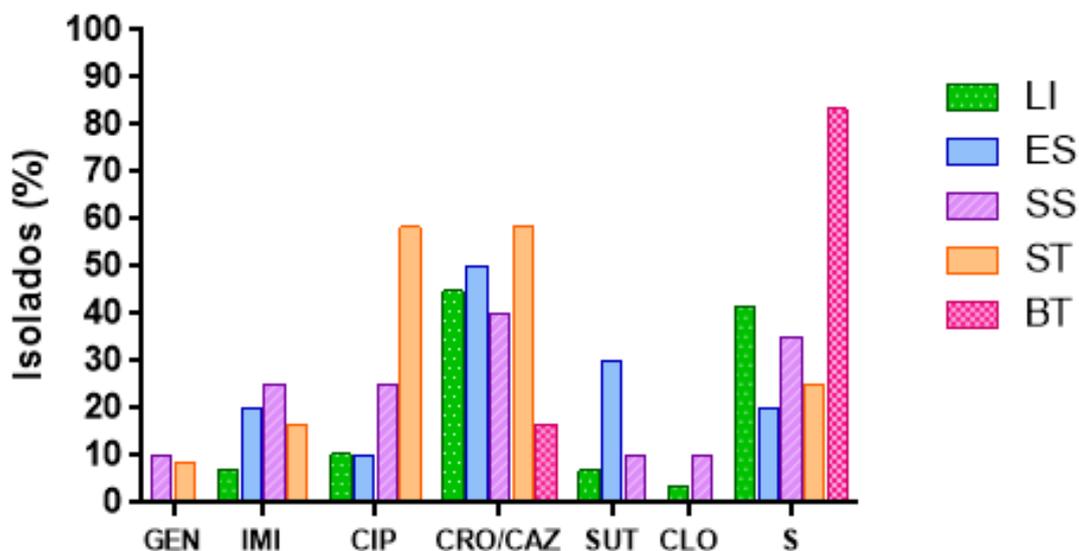


Figura 10 Porcentagem de isolados BGN resistentes ao longo dos pontos amostrais: Lagoa de captação (LI), efluente industrial (ES), saída do tratamento secundário (SS), saída do tratamento terciário (ST), bacia da torre de resfriamento (BT), pela técnica de disco difusão. GEN: gentamicina; IMI: imipenem; CIP: ciprofloxacino; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; SUT: sulfazotrim; S: suscetível a todos os antimicrobianos testados.

Analisando os grupos individualmente, percebemos que *Enterobacterales* e *Aeromonas* sp. foram isoladas apenas de LI e SS e este ponto, após o tratamento secundário apresenta resistentes para a maioria dos antimicrobianos testados, com exceção de gentamicina. *Enterobacterales* resistentes a imipenem e cloranfenicol foram identificados também na lagoa, porém com claro aumento nos percentuais após passagem pelo tratamento secundário; corroborando essa diferença de perfil, a quantidade de isolados suscetíveis a qualquer antimicrobiano foi maior na lagoa e menor após passagem pelo tratamento secundário (**Figura 11**).

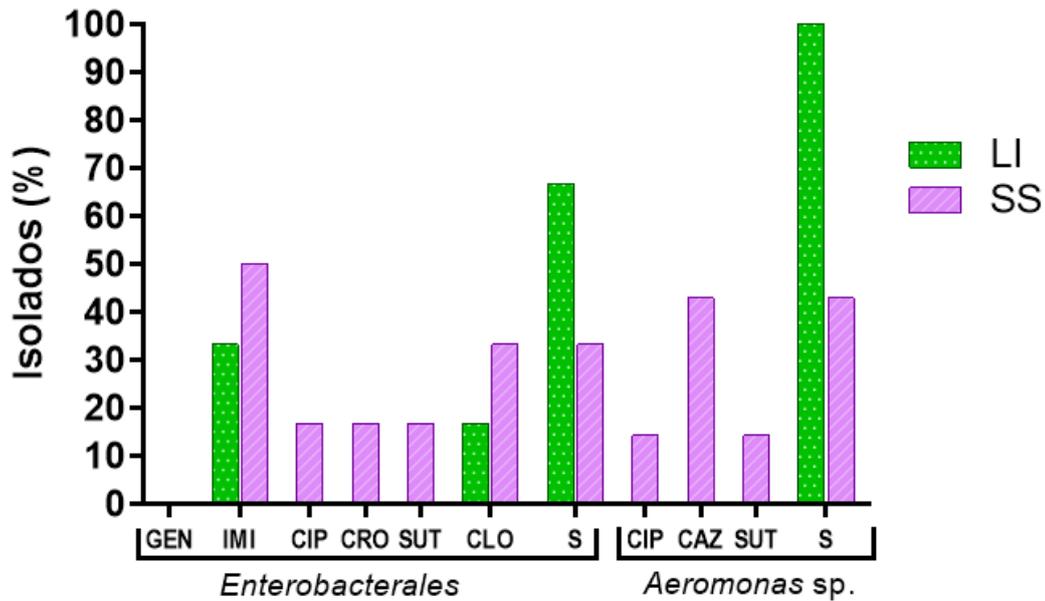


Figura 11 Percentagem de isolados de *Enterobacteriales* e *Aeromonas sp.* resistentes ao longo dos pontos amostrais: Lagoa de captação (LI), saída do tratamento secundário (SS). GEN: gentamicina; IMI: imipenem; CIP: ciprofloxacino; CRO: ceftriaxona; SUT: sulfazotrim; CLO: cloranfenicol; S: suscetível a todos os antimicrobianos testados.

Para isolados do gênero *Acinetobacter*, resistentes a ceftazidima foram presentes em todos os pontos, em maior porcentagem em SS e ST (**Figura 12**). Observou-se um pequeno aumento de isolados resistentes a imipenem (ausente nos isolados de LI), ciprofloxacino e sulfazotrim após passagem pelo tratamento secundário. Todavia, a proporção de suscetíveis permaneceu a mesma entre os pontos.

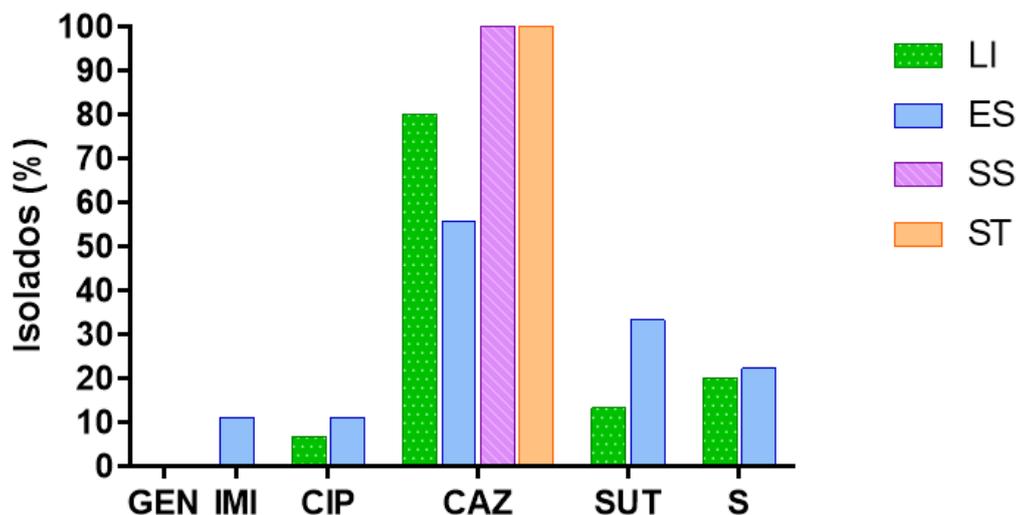


Figura 12 Percentagem de isolados de *Acinetobacter sp.* resistentes ao longo dos pontos amostrais: Lagoa de captação (LI), efluente industrial (ES), saída do tratamento secundário (SS), saída do tratamento terciário (ST). GEN: gentamicina; IMI: imipenem; CIP: ciprofloxacino; CAZ: ceftazidima; SUT: sulfazotrim; S: suscetível a todos os antimicrobianos testados.

Pseudomonas sp. apresentou alta porcentagem de isolados com perfil resistente aos antimicrobianos avaliados e por estar presente em todos os pontos amostrados nos permite visualizar melhor a dinâmica de aumento ou redução na suscetibilidade (**Figura 13**). Há aumento na porcentagem de resistentes em SS, quando comparado com LI, tal fato é observado para todos os antimicrobianos testados, com destaque para a ausência de resistentes a gentamicina e imipenem em LI. Também é possível notar que BT apresenta maior parte dos isolados com perfil suscetível ou com poucos resistentes.

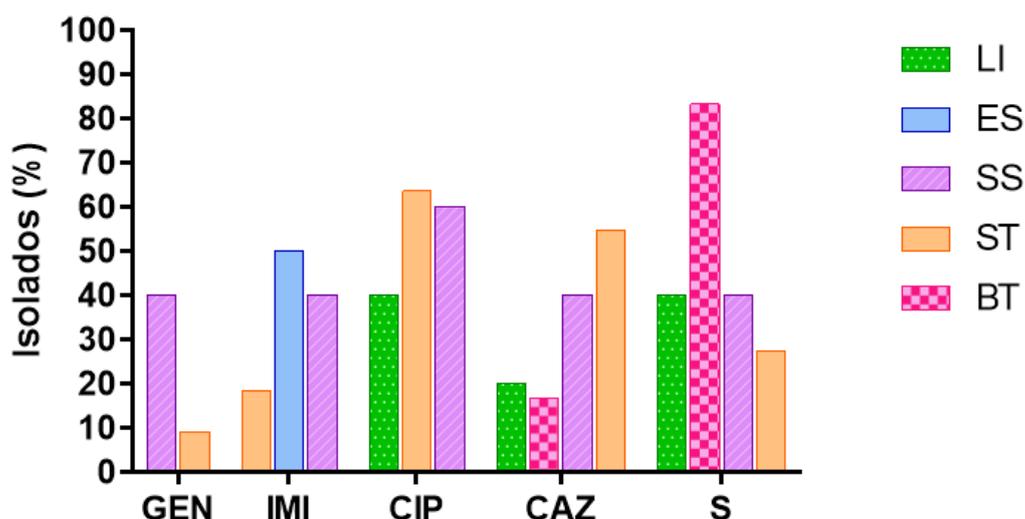


Figura 13 Porcentagem de isolados de *Pseudomonas* sp. resistentes ao longo dos pontos amostrais: Lagoa de captação (LI), efluente industrial (ES), saída do tratamento secundário (SS), saída do tratamento terciário (ST), bacia da torre de resfriamento (BT). GEN: gentamicina; IMI: imipenem; CIP: ciprofloxacino; CAZ: ceftazidima; S: suscetível a todos os antimicrobianos testados.

5.3.2. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de microdiluição

Diferenças no perfil de suscetibilidade pelo método de microdiluição também são observadas entre os pontos, novamente com redução na proporção de isolados totalmente suscetíveis aos antimicrobianos testados em SS quando comparado a LI. Para o grupo de *Acinetobacter* sp., não há isolados sem resistência aos antimicrobianos testados em SS e é claro o aumento de resistentes a ciprofloxacino e ceftriaxona. Os isolados de *Pseudomonas* sp. em LI apresentaram resistência apenas a ceftriaxona, sendo suscetíveis aos demais antimicrobianos, enquanto nos demais pontos há isolados resistentes. Para *Enterobacterales*

e *Aeromonas* sp., destaca-se a redução na proporção de isolados sem resistência aos antimicrobianos testados e aumento de resistentes a ciprofloxacino (**Figura 14**).

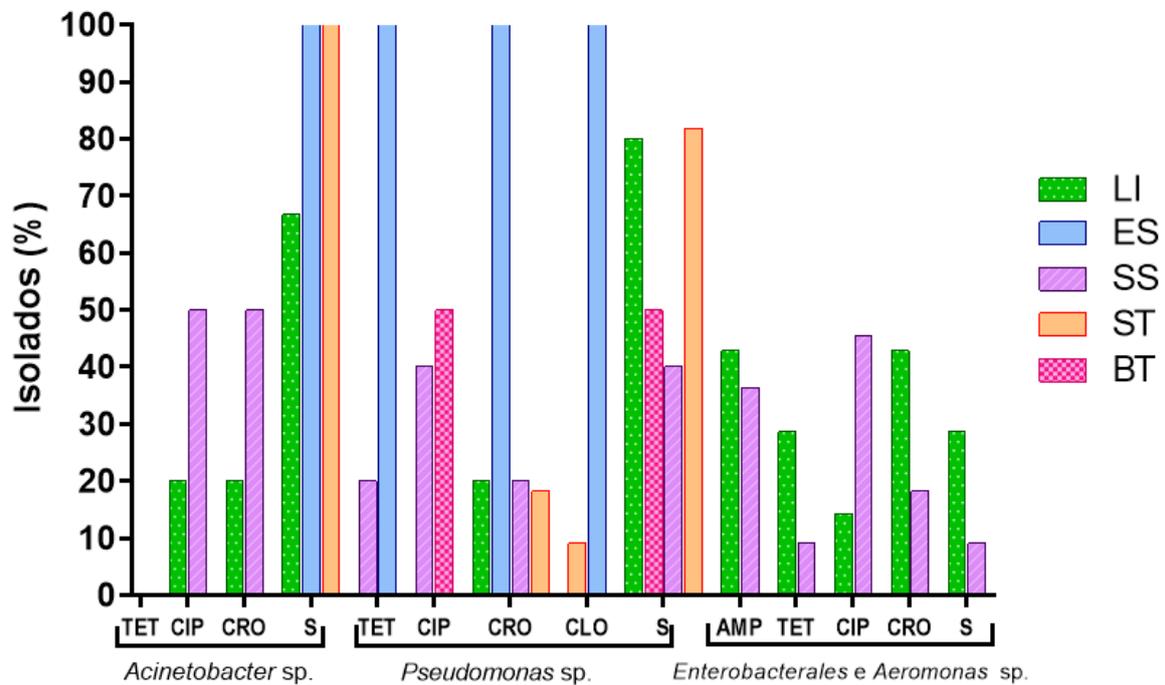


Figura 14 Porcentagem de isolados BGN resistentes, separados por grupos, ao longo dos pontos amostrais: Lagoa de captação (LI), efluente industrial (ES), saída do tratamento secundário (SS), saída do tratamento terciário (ST), bacia da torre de resfriamento (BT), pela técnica de microdiluição. TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; CRO: ceftriaxona AMP: ampicilina; CLO: cloranfenicol; S: suscetível a todos os antimicrobianos testados.

A vantagem da técnica de microdiluição é a definição da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para os isolados em estudo, parâmetro muito útil para amostras que não possuem valores de referência bem estabelecidos. A maioria dos gêneros tipicamente sem interesse clínico apresentou valores de CIM altos para ceftriaxona e também, para cloranfenicol, com menores valores (**Figura 15, Anexo G**).

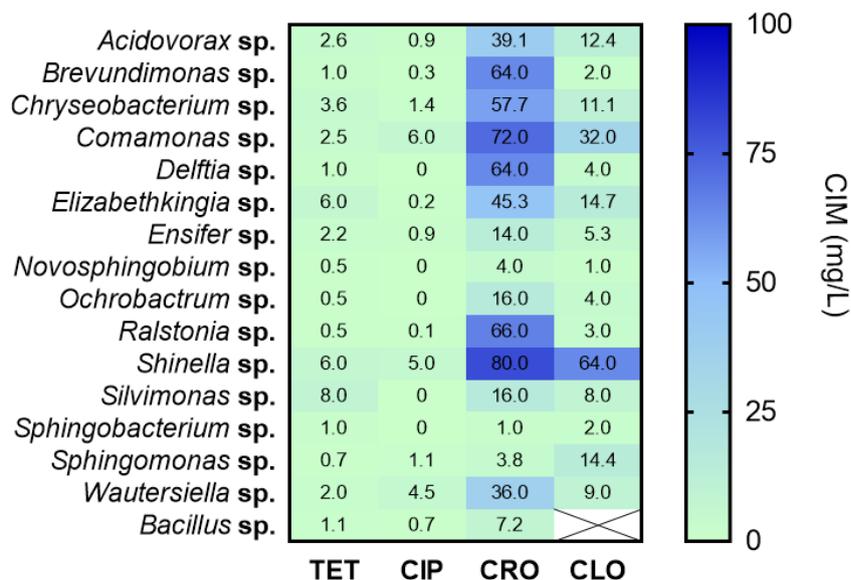


Figura 15 Valores médios de CIM para diferentes gêneros sem valores de referência. TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; CRO: ceftriaxona; CLO: cloranfenicol.

5.3.3. Ensaios com diferentes tempos de exposição e concentrações de cloro

Os padrões de redução de viabilidade celular de isolados com perfil de suscetibilidade ou não a antimicrobianos após exposição a diferentes concentrações de cloro estão apresentados em **Figura 16** e **Figura 17**. O isolado suscetível de *Bacillus sp.* foi o único com mais de 96% de redução de viabilidade quando exposto às concentrações de 0,2 e 2 mg/L de cloro livre por 24h. Nota-se que para a concentração de 20mg/L, os isolados resistentes a antimicrobianos sobreviveram à ação do NaClO, mesmo que a viabilidade tenha reduzido drasticamente (99,7%). A concentração de 200 mg/L reduziu próximo a 100% das células viáveis de quase todos os isolados, com exceção do isolado resistente de *Pseudomonas sp.*, o único com células viáveis (0,1%) após 24h. Para esta concentração, foi observada grande redução da turbidez do meio, indicativo da oxidação dos compostos orgânicos.

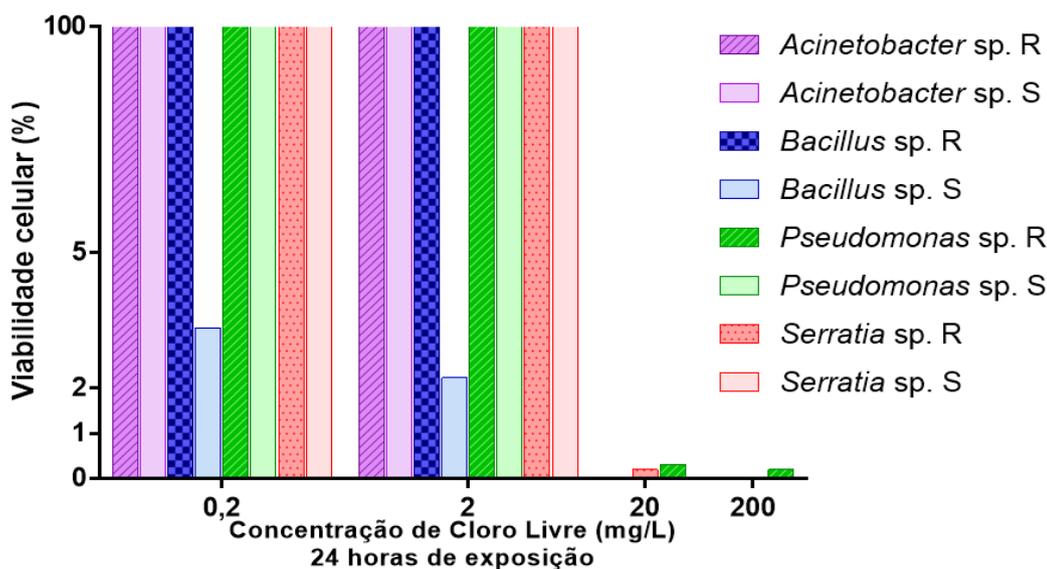


Figura 16 Viabilidade celular dos isolados resistentes (R) e suscetíveis (S) a antimicrobianos, após exposição a diferentes concentrações de cloro, por 24 horas. Eixo y: escala descontínua.

Quando avaliado o tempo de exposição, notou-se que as maiores concentrações possuem ação rápida sobre a viabilidade celular, sendo observada eliminação total das bactérias na concentração de 200 mg/L em menos de 5 min, enquanto as menores concentrações precisaram de algumas horas (**Anexo H**). O isolado resistente de *Pseudomonas* sp. foi o único a apresentar células viáveis após 1h de exposição a 200 mg/L de cloro. No tempo de 1h, 20 mg/L foi o suficiente para reduzir quase a totalidade de viáveis para o isolado suscetível de *Pseudomonas* sp. e de ambos os *Bacillus* sp., e com 3h, teve o mesmo efeito para os isolados sensíveis de *Acinetobacter* sp. e *Serratia* sp. (**Figura 17**). De modo geral, para a concentração de 20 mg/L, foi requerido maior tempo para inativação das espécies resistentes quando comparadas aos isolados sensíveis. Foi necessário 3h a 20mg/L, para reduzir mais de 96% da viabilidade dos isolados resistentes de *Acinetobacter* sp., 98,5% de *Pseudomonas* sp. e 99,2% de *Serratia* sp. Essa concentração teve uma boa relação tempo-concentração e por isso foi escolhida como mediana nos testes posteriores de cloro.

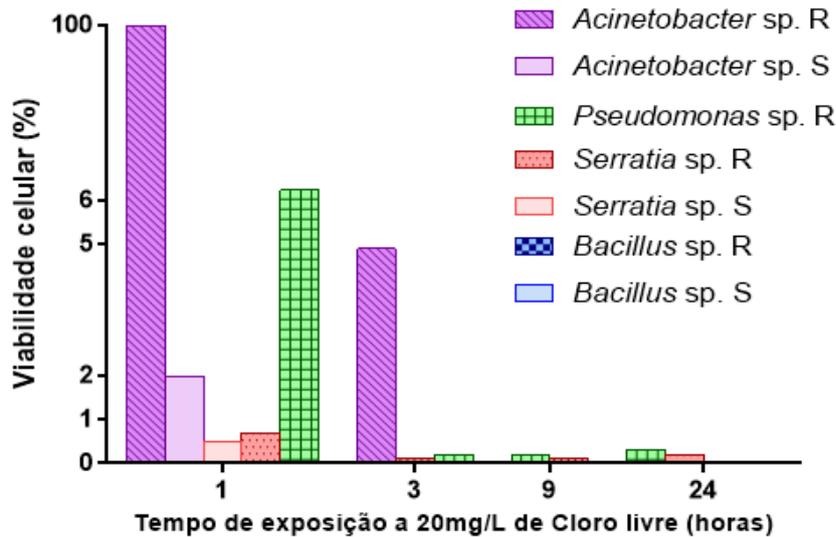


Figura 17 Viabilidade celular dos isolados resistentes (R) e suscetíveis (S) a antimicrobianos, após exposição a concentrações de 20mg/L de cloro, em diferentes tempos. Eixo y: escala descontínua.

5.3.4. Teste de suscetibilidade ao cloro pelo método de microdiluição

Os ensaios de microdiluição demonstraram grande heterogeneidade quanto ao perfil de suscetibilidade ao cloro entre os isolados. Houve diferença estatística entre os pontos amostrados ($p < 0,05$), porém não entre as coletas (**Anexo I**). Os pontos LI e BT, apresentaram semelhança de perfil, com mais isolados com CIM ≥ 25 mg/L, sendo respectivamente, 60% e 50% dos isolados, enquanto nos demais pontos essa proporção ficou em torno de 30%. Os valores de CIM individuais podem ser consultados no **Anexo F**. Não houve correlação entre os dados de CIMs de cloro e antimicrobianos nas análises de correlação usando o coeficiente de Pearson ($p > 0,05$) (**Anexo J**), sugerindo que os mecanismos de não-suscetibilidade ao cloro não estão diretamente relacionados com maiores CIM a antimicrobianos.

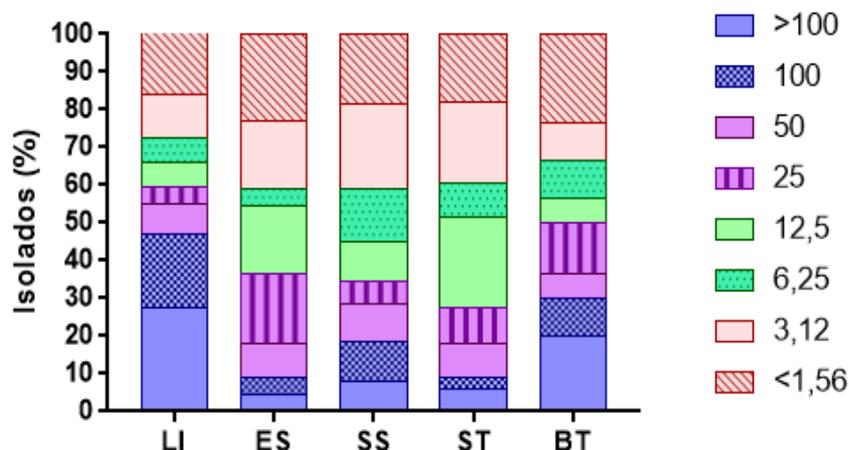


Figura 18 Porcentagem de isolados com cada CIM ao cloro (mg/L), de cada ponto amostral: Lagoa de captação (LI), efluente industrial (ES), saída do tratamento secundário (SS), saída do tratamento terciário (ST), bacia da torre (BT).

5.3.5. Resistência Adaptativa

Alteração na resposta adaptativa ao cloro foi determinada pela avaliação das mudanças nos valores de CIM após exposições a concentrações crescentes de cloro e os resultados estão apresentados na **Tabela 3**. Foi observado aumento no CIM para quase todos os isolados avaliados. Os maiores aumentos foram observados para *E. meningoseptica* M11, *K. pneumoniae* M152 e *A. hydrophila* M94, sendo necessárias nove passagens em concentrações crescentes de cloro. Valores intermediários foram observados para *P. alcaligenes* M210, *C. freundii* M133 e *A. baumannii* M170. Para *S. marcescens* M34 e *Enterobacter* sp. M73, houve pouca ou nenhuma diferença em relação a CIM do isolado selvagem. Os isolados adaptados foram estocados e reativados após uma semana e, novamente após um mês e meio posterior ao teste de adaptação. Na reavaliação, nota-se que os isolados M11, M170 e M210 apresentaram CIM menores, mais próximas ao valor antes da adaptação. M34 apresentou um valor ainda menor do que seu valor original. M73, novamente não apresentou variações. Para os isolados M94, M133 e M152 houve manutenção na CIM adaptada, mantendo-se maior que a CIM do isolado sem adaptação ao cloro.

Tabela 3: Concentrações inibitória mínimas (CIM) ao cloro antes e após adaptação ao cloro.

Isolado	ID	CIM inicial ($\mu\text{g/mL}$)	CIM adaptado ($\mu\text{g/mL}$)	CIM adaptado ^a ($\mu\text{g/mL}$)	CIM adaptado ^b ($\mu\text{g/mL}$)
<i>E. meningoseptica</i>	M11	$\leq 1,56$	100	50	$\leq 1,56$
<i>S. marcescens</i>	M34	50	75	50	6,25
<i>Enterobacter</i> sp.	M73	100	75	100	100
<i>A. hydrophila</i>	M94	3,12	100	50	50
<i>C. freundii</i>	M133	3,12	50	100	100
<i>K. pneumoniae</i>	M152	$\leq 1,56$	100	100	100
<i>A. baumannii</i>	M170	3,12	12,5	50	$\leq 1,56$
<i>P. alcaligenes</i>	M210	$\leq 1,56$	75	100	3,12

a: teste repetido após uma semana da adaptação ao cloro

b: teste repetido após 1,5 mês da adaptação ao cloro

Os isolados adaptados foram caracterizados quanto ao perfil de suscetibilidade a diferentes antimicrobianos pelo teste de microdiluição (**Tabela 4**). Constatou-se que não houve diferença nas CIM de ciprofloxacino. Para ampicilina, os isolados de *K.pneumoniae* e *A. hydrophila* demonstraram aumento da CIM, os demais isolados já apresentavam valor elevado. Para ceftriaxona, cinco dos isolados apresentaram aumento da CIM, alterando-se para o perfil resistente. Para tetraciclina, três isolados não apresentaram diferenças significativas, enquanto dois apresentaram um discreto aumento na CIM e três apresentaram redução da CIM, esses alterando o perfil de suscetibilidade. Apenas o isolado de *E. meningoseptica* apresentou redução da CIM tanto para ceftriaxona e para tetraciclina.

Tabela 4: Valores de CIM antes e após adaptação a concentrações de cloro.

ID	AMP		CIP		CRO		TET	
	S	A	S	A	S	A	S	A
M11	-	-	<0,25	<0,25	64	<2	8	<0,5
M34	>64	>64	<0,25	<0,25	1	8	2	2
M73	>64	>64	<0,25	<0,25	2	4	<0,25	1
M94	<0,5	>64	<0,25	<0,25	<0,25	8	<0,25	2
M133	>64	>64	<0,25	<0,25	1	16	32	2
M152	8	32	<0,25	<0,25	4	4	16	1
M170	-	-	<0,25	<0,25	-	-	1	<0,5
M210	-	-	<0,25	<0,25	1	16	1	2

S: isolado selvagem, antes da exposição ao cloro; A: isolado após exposição crescente ao cloro.

AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacino; CRO: ceftriaxona; TET: tetraciclina. -: não avaliado

Células vermelhas indicam perfil resistente e amarelas, perfil intermediário de suscetibilidade.

6. DISCUSSÃO

Cada ambiente aquático amostrado por este trabalho apresenta características físico-químicas bastante distintas entre si, proporcionando as diferenças observadas nos parâmetros microbiológicos estudados de densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes a antimicrobianos de importância clínica. De maneira geral, a densidade bacteriana é dependente das taxas de crescimento microbiano que por sua vez responde a disponibilidade de matéria orgânica (substrato), bem como condições abióticas, como temperatura, pH e presença de compostos danosos às estruturas celulares e processos fisiológicos.

A diferença observada entre as duas coletas deve-se a variação sazonal sendo que a primeira se realizou em um período caracterizado por chuvas (WEATHER SPARK, 2019) e, especialmente em LI e SS, pode ter influenciado em um maior aporte de matéria orgânica, resultando em maior densidade bacteriana. Neste estudo, apenas duas coletas foram realizadas, com diferenças médias de uma unidade logarítmica entre elas, o estudo de ANTUNES; BALLARINI; SAND (2019) avaliou lagoas facultativas em quatro meses diferentes e constataram mudanças na densidade de BHT de até cinco unidades logarítmicas entre coletas, porém não avaliaram essa relação com diferentes condições meteorológicas.

A lagoa de captação estudada está presente em uma região metropolitana, se caracteriza como um ambiente aberto, sem adição de biocidas para controle microbiológico e com abundância de matéria orgânica, associada ao recebimento de água de escoamento superficial, drenagem urbana, agrícola e lançamentos de efluentes domésticos e industriais (SUPRAM, 2008). A heterogeneidade dos afluentes desse ambiente, inclusive bastante impactados pela ação antrópica, conforme discutida por ANDRADE et al. (2014), propicia diversidade nas espécies encontradas, inclusive com variações temporais; embora, perceba-se que há um “núcleo” dessa comunidade bacteriana que se mantém inalterada. Observou-se que os gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Sphingomonas* e *Enterobacter* foram presentes em ambas as coletas e também nos pontos amostrais subsequentes. Em especial, os três primeiros gêneros mencionados parecem estar presentes em maior quantidade em diferentes tipos de água e efluentes, indicando resiliência às alterações ambientais (ANTUNES; BALLARINI; SAND, 2019; OLIVEIRA; MARGIS, 2015). Destaca-se também que foi o ponto com maior diversidade de isolados *Enterobacterales*, que embora seja uma ordem amplamente distribuída em diversos

ambientes, também possui espécies importantes como causadores de doenças em humanos (LIMA-BITTENCOURT et al., 2007).

A diversidade de bactérias resistentes identificadas na lagoa de captação (LI) pode estar relacionada ao despejo de esgoto sanitário, que pode carrear tanto microrganismos já resistentes ou resíduos de substâncias com potencial de seleção de resistentes, bem como ao despejo dos efluentes tratados no tratamento secundário da própria refinaria (RODRIGUES, 2004). Destaca-se que foi o único ponto a apresentar bactérias, pela técnica de NMP, na presença de dose elevada de ciprofloxacino, um dos antimicrobianos mais consumidos por via oral (WHO, 2018). Tem sido observada uma maior ocorrência de isolados resistentes a antimicrobianos em ambientes impactados pela ação antrópica quando comparado aos não impactados (YANG et al., 2018), com indícios de que micropoluentes como os antimicrobianos possam exercer pressão seletiva. Em revisão de YANG et al. (2018), foi demonstrado que lagos e rios próximos a áreas urbanas de vários países apresentam maiores quantidades de resíduos de fármacos antimicrobianos bem como elevada densidade de BRAs e GRAs, comparado com ambientes com menor influência antrópica. Em estudo de rios do Parque Nacional da Serra do Cipó - MG, foi relatado alta frequência de isolados *Enterobacteriaceae* resistentes a antimicrobianos, com até 77% deles apresentando multirresistência, com destaque para 80% dos isolados sendo resistentes a ampicilina, e uma quantidade menor (17%) de isolados resistentes a aminoglicosídeos (LIMA-BITTENCOURT et al., 2007). Neste trabalho, além de ampicilina, houve maior quantidade de isolados resistentes a ciprofloxacino, imipenem (especialmente para *Enterobacterales* e *Aeromonas* sp.) e cefalosporinas (especialmente para *Acinetobacter* sp.). Muitas espécies, como *Klebsiella* sp., *Serratia* sp. e *Acinetobacter* sp. possuem resistência intrínseca a ampicilina e/ou cefalosporinas (CLSI, 2020), logo não são passíveis de transmissão ou aquisição dos genes de resistência a esses antimicrobianos. Para *Acinetobacter* sp. estudos como o de NARCISO-DA-ROCHA; VAZ-MOREIRA; MANAIA (2012) demonstram que esse é um gênero ubíquo em sistemas aquáticos, mas que apenas uma parcela, próximo a 20% dos isolados testados, possui resistência adquirida a antimicrobianos.

A densidade de BHT na água tratada pela ETA foi reduzida a níveis não detectáveis pela metodologia utilizada, comprovando a eficácia do tratamento e a alta qualidade da água disponibilizada para as diversas atividades industriais, porém não pode-se excluir a possibilidade da persistência de GRAs, já sugerida em outros trabalhos (HAO et al., 2019; OSINSKA et al., 2019; PAZDA et al., 2019; ZHANG et al., 2017), porém não avaliados

neste estudo. HAO et al. (2019) identificaram 22 GRAs intra e extracelulares em amostras de água de torneira com cloro residual de até 0,11 mg/L. Os maiores valores encontrados para genes extracelulares foram $1,3 \cdot 10^5$ cópias/L de amostra para genes de resistência a sulfonamidas e $4,5 \cdot 10^4$ cópias/L de amostra para genes de resistência a tetraciclina, podendo esses valores serem até 10 vezes maiores para genes intracelulares. Fenômenos semelhantes são observados no tratamento diferentes do das ETAs, OSINSKA et al. (2019), por exemplo, identificaram até $1,6 \cdot 10^7$ e $2 \cdot 10^6$ UFC/mL de bactérias resistentes a β -lactâmicos e tetraciclinas, respectivamente, antes do tratamento do efluente e demonstrou reduções desses valores, variando de 68 a 99%, após sistema de lodo ativado (tratamento biológico); porém ao analisar o resistoma (conjunto de GRAs) por meio de sequenciamento metagenômico, alguns GRAs reduziram 100%, enquanto outros apenas 13%, como foi o caso do gene de resistência a tetraciclina que permaneceu em concentrações de $3,6 \cdot 10^{-2}$ cópias/cópias de 16s rRNA. ZHANG et al. (2017), de modo semelhante, avaliaram a remoção de quatro GRAs ao longo de um tratamento de efluente, destacando que o tratamento biológico removeu até 2,3 log de GRAs extracelulares enquanto a ozonização seguida de cloração (4,2 mg/L de cloro livre) reduziu apenas 0,8 log, de modo que houve um aumento relativo de GRAs especialmente para macrolídeos e tetraciclina. Tais estudos demonstram que independente da qualidade da água tratada, seja para consumo humano ou simplesmente para atingir limites mínimos para descarte em corpos d'água, mesmo com redução substancial de BRAs, GRAs podem não ser totalmente removidos ou, ainda, aumentarem em quantidade, constituindo reservatórios para disseminação de resistência a antimicrobianos (PAZDA et al., 2019).

O efluente industrial coletado (ES) apresentou densidade de bactérias heterotróficas totais (BHT) semelhante à lagoa, porém com menor variedade de gêneros, 16 exclusivos em LI contra quatro exclusivos em ES, com mais cinco gêneros compartilhados entre os dois pontos. A diferença dos isolados entre as coletas de ES (sete gêneros na primeira coleta e apenas três na segunda), pode ser relacionado a variação da composição do efluente ou a diferença na amostragem entre as duas coletas, uma vez que na primeira coletou-se o efluente quando era despejado na lagoa de mistura completa e na segunda coleta, na saída do tanque de flotação. Todavia, a presença de bactérias indica que os parâmetros físico-químicos ainda são propícios para a multiplicação bacteriana mesmo após pré-tratamento, podendo haver óleos, graxas, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados e matéria orgânica em suspensão (GUIMARÃES, 2012). Inclusive, diversos gêneros amostrados neste ponto (ES), como *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Comamonas* e *Bacillus*, já foram relatados como bons

degradadores de compostos aromáticos (SHOKROLLAHZADEH; AZIZMOHSENI; GOLMOHAMMAD, 2008). Destaca-se que não se isolou *Enterobacterales* desse ponto. O efluente apresentou menor quantidade de BRAs pela técnica de número mais provável em relação a LI. Pela técnica de disco-difusão a quantidade relativa de *Acinetobacter* sp. resistente aos antimicrobianos testados também foi menor, enquanto o grupo de bacilos Gram positivos apresentou alta proporção de resistentes comparado aos demais pontos amostrais, porém este pode representar um viés devido à pouca quantidade de isolados.

A saída do tratamento secundário, caracterizado pela passagem do efluente industrial por uma lagoa aerada de mistura completa, lagoa facultativa e biodisco, apresentou predominância de bactérias Gram negativas, com 87% delas apresentando resistência a pelo menos um antimicrobiano testado. Deste modo, foi o ponto amostral com maior densidade de bactérias totais e resistentes a antimicrobianos. Tratamentos biológicos são essenciais para o tratamento de efluentes, todavia têm sido apontados como reservatórios de BRAs e GRAs (BARANCHESHME; MUNIR, 2019; PAZDA et al., 2019; SZCZEPANOWSKI et al., 2009; ZHANG et al., 2017). Os pontos LI e SS apresentaram a maior densidade de BRAs, sendo os maiores valores para bactérias resistentes à ampicilina e ceftriaxona, variando de $4 \cdot 10^2$ - $1,2 \cdot 10^4$ e $8,8 \cdot 10^1$ - $7,7 \cdot 10^3$ NMP/mL, respectivamente. O estudo de AALI et al. (2014) demonstrou densidades maiores quando avaliado amostras de esgoto bruto, com $1,2 \cdot 10^7$, $3,3 \cdot 10^7$ e $5,5 \cdot 10^7$ UFC/100 mL, para resistentes a gentamicina, cloranfenicol e ceftazidima, respectivamente, porém o autor ressalta que após passagem pelo tratamento de efluentes, BRAs para gentamicina foram totalmente removidas enquanto para ceftazidima, a frequência de BRAs aumentou, especificamente na saída da lagoa de estabilização (tratamento biológico). Um estudo realizado com isolados bacterianos de lodo ativado e após o final do tratamento de efluentes, na Alemanha, detectou por PCR 140 GRAs associados a plasmídeos, destacando que especificamente os genes de resistência para trimetoprima, quinolonas e sulfonamidas foram detectados em quantidades similares nos dois pontos. Adicionalmente, os plasmídeos foram analisados por abordagem metagenômica e constatou-se muita similaridade entre os isolados da ETE com isolados clínicos (SZCZEPANOWSKI et al., 2009). Deve-se salientar que na presença de BRAs pode ocorrer a conjugação bacteriana, com a troca de material genético mediada por plasmídeos conjugativos, promovendo assim a disseminação da resistência a antimicrobianos; porém outro mecanismo importante de aquisição de genes de resistência é a transformação bacteriana, com a captura e incorporação de fragmentos de DNA livres. Nesse sentido, ZHANG et al. (2017) demonstraram que em

estações de tratamento de efluentes, com tratamentos biológicos ou físico-químicos, a remoção de GRAs livres pode ser muito baixa, tornando esses ambientes aquáticos potenciais locais de risco para persistência e transferência horizontal de GRAs.

Na primeira coleta, observou-se a presença de *Actinobacteria* e *Firmicutes*, e nas duas amostragens houve predominância de isolados de *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, estando todos esses, mesmo com a variação sazonal, em acordo com achados de outros estudos semelhantes a este, dedicados a caracterizar a comunidade microbiana de diferentes amostras, como lodo proveniente de tratamento de efluente sanitário (NASCIMENTO et al., 2018) e efluente industrial de tratamento secundário (SILVA-BEDOYA et al., 2016). Obteve-se mais isolados de *Gammaproteobacteria*, embora maior quantidade de *Alpha* e *Betaproteobacteria* seja relatada em outros estudos (CYDZIK-KWIATKOWSKA; ZIELIN, 2016; NASCIMENTO et al., 2018), porém ressalta-se que os resultados poderiam ser diferentes com o uso de outras metodologias de cultivo ou por abordagem metagenômica. Considerando a natureza do tratamento biológico, que prevê a remoção de matéria orgânica e inorgânica (especialmente nitrogênio e fósforo), a presença dos microrganismos encontrados é coerente considerando suas características metabólicas versáteis e de rápido desenvolvimento. Entre essas características pode-se exemplificar a produção de lipases por *Serratia* sp. e *Klebsiella* sp., também isoladas por NASCIMENTO et al. (2018) em ETE; degradação de diferentes compostos orgânicos e capacidade de nitrificação heterotrófica e/ou desnitrificação aeróbica de algumas estirpes de *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Delftia* sp., *Chryseobacterium* sp. e *Comamonas* sp. (MAINTINGUER et al., 2013; YAO et al., 2013).

Nas amostras coletadas após tratamento terciário, há uma expressiva redução tanto na densidade de bactérias totais quanto de BRAs, demonstrando, como outros trabalhos, a eficiência dos tratamentos físicos (como filtros de areia e carvão) e químicos (cloração) na remoção desses microrganismos (LIN et al., 2016; RAVASI et al., 2019; SAMIR et al., 2019). A bacia da torre de resfriamento e a amostra do tratamento terciário, em contraponto aos ambientes anteriores, representam ambientes com menor interferência do meio externo, sendo sistemas semi-aberto e fechado, respectivamente, com menores teores de nutrientes inorgânicos e matéria orgânica, além da presença do biocida usado na desinfecção da água. Assim a presença de bactérias é limitada e as densidades atingidas bem menores do que nos demais pontos. Ressalta-se que a bacia da torre de resfriamento apresentou menor variação sazonal, justamente por sua condição de controle de parâmetros físico-químicos, como pH, sais e matéria orgânica, e menor interferência do ambiente externo.

Na bacia da torre de resfriamento a densidade bacteriana se manteve menor, devido principalmente ao doseamento de cloro feito de modo a garantir a manutenção de concentrações residuais de cloro na faixa de 0,5 ppm, para garantir níveis de bactéria abaixo de 10^4 UFC/mL e prevenir a multiplicação de bactérias patogênicas (LUDENSKY, 2005). Mesmo nessas populações menores foi possível identificar bactérias resistentes a antimicrobianos, podendo ser um indicativo de que sobreviveram às etapas anteriores e puderam se restabelecer nesse ambiente, mesmo com a cloração. De fato, alguns estudos têm mostrado que a estrutura da comunidade de bactérias em bacias de torres está relacionada aos grupos presentes na água de alimentação, uma vez que esta é constantemente adicionada para repor os volumes de água perdidos na evaporação, e também com a presença de bactérias formadoras de biofilme; que se estabelecem nas superfícies e com seu desenvolvimento desprendem fragmentos contendo matriz e bactérias na água (TSAO et al., 2019). Na torre de resfriamento foi observada a manutenção de um “núcleo” de gêneros que não se alteraram sazonalmente. Nas duas coletas foram identificados *Acidovorax* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. e *Staphylococcus* sp. e os três primeiros mencionados, juntamente com *Chryseobacterium* sp., também estavam presentes na água de alimentação da torre (ST). Este fato já foi relatado por outros autores por meio de abordagem metagenômica: LLEWELLYN et al. (2017) constataram alta similaridade entre as comunidades bacterianas de torres de resfriamento de diferentes estados Norte Americanos, estando *Proteobacteria* (79,5%) e *Bacteroidetes* (8,1%) entre os filos mais abundantes, sem variar com sazonalidade ou diferentes climas; PINEL et al. (2020) constataram que a comunidade bacteriana na torre era muito semelhante a água de alimentação, porém após a cloração, grupos bacterianos como *Alphaproteobacteria* mostravam maior tolerância ao cloro e menor declínio populacional, passando a ser relativamente mais abundantes do que os demais grupos.

Além das características particulares de cada ponto como já mencionado, cada tratamento empregado pode apresentar um efeito distinto no perfil da comunidade bacteriana, sendo que, em especial os tratamentos químicos podem resultar na redução, tanto na densidade quanto na riqueza de espécies (BECERRA-CASTRO et al., 2016).

Como descrito, o perfil das comunidades bacterianas variou nos diferentes compartimentos de água e com a época de coleta. Independente destes fatores, foi observada predominância de *Proteobacteria* (69% de todos os isolados), embora mudanças na composição e proporção dos demais filos tenham sido observadas. *Firmicutes* (17%) e *Bacteroidetes* (10%) também se mostraram presentes de modo semelhante a outros estudos

(NUMBERGER et al., 2019). POTGIETER et al. (2018) avaliaram a dinâmica da comunidade bacteriana de um sistema de tratamento de água que recebia diferentes biocidas clorados, por dois anos, fornecendo informações que não podem ser obtidas em estudos pontuais como o nosso, e demonstrou que *Proteobacteria* era mais abundante independente da sazonalidade ou regime de desinfecção adotado. A predominância de *Proteobacteria* é apontada por sua capacidade de resistir a desinfecção ou, ainda, por sua maior taxa de multiplicação ou melhores mecanismos de reparo, promovendo seu restabelecimento nesses sistemas aquáticos, se sobressaindo aos demais filos (BECERRA-CASTRO et al., 2016).

NUMBERGER et al. (2019) destacam que *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. e *Aeromonas* sp. são gêneros comumente encontrados em ambientes de tratamento de efluentes, com propensão a adquirir resistência a múltiplos antimicrobianos e ainda com a versatilidade de se adaptarem a vários ambientes, podendo inclusive serem patógenos oportunistas. No presente estudo também foram identificadas diferentes enterobactérias, além de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* sp. e *Elizabethkingia* sp. que, embora pouco convencionais, apresentam interesse clínico, inclusive relacionado a multirresistência e resistência intrínseca a antimicrobianos, como aminoglicosídeos, cefalosporinas e carbapenêmicos (GOVINDASWAMY et al., 2018; KIRBY et al., 2004; SÁNCHEZ, 2015).

Além da detecção de bactérias com resistência aos antimicrobianos, houve também a presença de bactérias resistentes a altas concentrações de cloro. De acordo com a legislação brasileira (PORTARIA N.º 1469, artigo 13º), a água para consumo humano deve conter, após tratamento, no mínimo 0,2 µg/mL de cloro em qualquer ponto da rede de distribuição para controlar o crescimento de microrganismos. Na indústria de alimentos, no ciclo principal de trabalho são mantidas concentrações de até 7 µg/mL e durante a limpeza, de até 25 µg/mL (ANDRADE; MARTYN, 1993). Estudos passados de nosso grupo registraram a manutenção média de 0,4 µg/mL de cloro livre e 1,7 µg/mL de cloro combinado, dosados na mesma bacia da torre de resfriamento aqui estudada (DOS SANTOS et al., 2015). Com isso, percebe-se que os valores estabelecidos pela legislação vigente, bem como os adotados na torre de resfriamento (máximo a 0,5 µg/mL) não são capazes de eliminar totalmente as bactérias avaliadas nesse estudo (algumas não suscetíveis a mais de 100 µg/mL). Embora possam conter a multiplicação, tão logo seja retirado o fator estressor elas podem se restabelecer novamente. A manutenção de doses subletais de cloro é apontada como um fator decisivo para a seleção de bactérias patogênicas, como *P. aeruginosa*, multirresistentes a

antimicrobianos (SHRIVASTAVA et al., 2004) e ainda, estudos apontam para o aumento na abundância de bactérias resistentes, especialmente *Proteobacteria*, a antimicrobianos após cloração, destacando as bombas de efluxo como mecanismos de resistência prevalentes (HOU et al., 2019; SHI et al., 2013). Aponta-se que bactérias já expostas ao cloro tendem a apresentar menor suscetibilidade ao mesmo em exposições posteriores (RIDGWAY; OLSON, 1982), tal fato pode ser observado nos isolados de BT, em que metade dos isolados apresentaram CIM iguais ou superiores a 25µg/mL. Outro ponto com maiores doses toleradas de cloro foi na lagoa de captação, que embora não receba cloração, não se pode excluir a possibilidade de presença de outras substâncias estressoras nesse ambiente, haja vista sua proximidade com zonas urbanas e industriais. Embora maiores CIMs ao cloro não tenham demonstrado relação direta com a resistência a antimicrobianos, nota-se que espécies resistentes a antimicrobianos ainda puderam ser detectadas mesmo após cloração, porém não se sobressaindo as espécies suscetíveis.

Avaliando as doses e tempos do cloro sobre isolados suscetíveis ou não a antimicrobianos, constatou-se a sobrevivência, mesmo que muito baixa, dos isolados resistentes. Todavia, para ter respostas conclusivas seria prudente realizar esse teste com mais isolados, tanto aumentando o número amostral como os gêneros testados, inclusive com perfis de suscetibilidade semelhantes. Em estudo similar, SAMIR et al. (2019), avaliou a sobrevivência de quatro isolados de *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, cada um com um representante suscetível e outro resistente a antimicrobianos, constatando que não houve diferença em sua resposta ao cloro, exigindo as mesmas doses e tempo de contato para inativação. Características morfológicas de determinadas espécies bacterianas podem estar relacionadas a menor suscetibilidade ao cloro, logo diferenças no perfil de comunidade de diferentes ambientes aquáticos também podem ser um fator importante. A composição da parede bacteriana, especialmente as ricas em ácidos graxos de cadeia longa, pode atuar como um fator de resistência ao cloro, retardando a difusão do cloro por sua associação com os componentes orgânicos (QIAO; CHAO, 2012). Outros componentes como cápsula, formação de exopolissacarídeos ou agregados celulares também poderiam ter efeito semelhante, tanto dificultando a difusão quanto inativando o cloro, com a formação de cloraminas ou organoclorados (MIR; MORATO; RIBAS, 1997; PINEL et al., 2020; RIDGWAY; OLSON, 1982).

O aumento das CIMs para cloro, observado no teste de adaptação a doses crescentes, pode se dar por alterações fisiológicas das bactérias contra o estresse oxidativo, por meio da

expressão de enzimas como a peroxidase e catalase, mudança na morfologia da parede celular, e ainda possíveis danos ao DNA causados pelo cloro podem ser reparados (BANSAL et al., 2018), de modo que o restabelecimento da CIM ‘selvagem’ em alguns isolados após reativação pode estar relacionada a interrupção da expressão dessas enzimas, uma vez que não há mais o agente estressor. Para alguns isolados, a adaptação ao cloro levou ao aumento da CIM de ceftriaxona e para outros a redução da CIM de tetraciclina, porém testes com maior número de isolados e diferentes antimicrobianos seriam necessários para concluir se essas alterações se relacionam com a adaptação ao cloro.

Em suma, os dados obtidos reiteram a importância de melhor conhecer e caracterizar potenciais reservatórios de BRAs e GRAs, bem como as estratégias adotadas para controle microbiológico, pois embora haja redução significativa na densidade de BHT após os tratamentos físico-químicos, a permanência de isolados resistentes tanto ao cloro quanto a antimicrobianos pode trazer futuros prejuízos, sejam eles para a empresa, para a saúde ou meio ambiente. A presença acentuada de BRAs e GRAs em ambientes impactados pela ação antrópica deve ser confrontada com sua presença ou ausência em ambientes naturais para demonstrar de fato o efeito do uso indiscriminado e generalizado de antimicrobianos e biocidas, bem como quais as implicações desses achados a longo prazo.

7. CONCLUSÃO

O perfil das comunidades bacterianas dos diferentes ambientes aquáticos estudados apresenta diferença, tanto em sua densidade quanto composição de gêneros.

Nota-se a eficiência dos tratamentos de efluentes na redução da densidade bacteriana total e resistentes a antimicrobianos.

A presença de bactérias resistentes a antimicrobianos na maioria dos pontos amostrados indica sua ubiquidade, porém seu aumento nos tratamentos secundários levanta a questão da transferência horizontal de genes de resistência a antimicrobianos.

Os testes com cloro indicam que muitos isolados tem capacidade de resistir a ação oxidante do cloro, em concentrações muito maiores as praticadas na indústria.

Menor suscetibilidade ao cloro não está diretamente relacionado a maior resistência a antimicrobianos.

8. REFERÊNCIAS

- AALI, R. et al. Monitoring and comparison of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in municipal and hospital wastewaters. *International journal of preventive medicine*, v. 5, p. 887, 2014.
- AGUIAR-PULIDO, V. et al. Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 12, p. 5–16, 2016.
- ANA - AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2019: informe anual. 2019.
- ANDRADE, C. F. et al. Avaliação dos impactos ambientais e o uso e ocupação do solo na microbacia do córrego do pintado, região metropolitana de belo horizonte - MG. p. 2–7, 2014.
- ANDRADE, Nelio jose De; MARTYN, Maria elilce. A água na indústria de alimentos. Viçosa: Imprensa Universitária, 1993.
- ANTUNES, T. C.; BALLARINI, A. E.; SAND, S. Van der. Temporal variation of bacterial population and response to physical and chemical parameters along a petrochemical industry wastewater treatment plant. v. 91, p. 1–18, 2019.
- BAILEY, G. W.; WHITE, J. L. Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil. n. 3656, p. 29–92, 1970.
- BANSAL, M. et al. *Listeria monocytogenes* Response to Sublethal Chlorine Induced Oxidative Stress on Homologous and Heterologous Stress Adaptation. v. 9, n. August, p. 1–9, 2018.
- BARANCHESHME, F.; MUNIR, M. Development of Antibiotic Resistance in Wastewater Treatment Plants Treatment Plants. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2019.
- BECERRA-CASTRO, C. et al. Proteobacteria become predominant during regrowth after water disinfection ☆. *Science of the Total Environment*, v. 573, p. 313–323, 2016.
- BEECH, I. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, n. 3, p. 181–186, 2004.
- BINET, P.; PORTAL, J. M.; LEYVAL, C. Dissipation of 3 ± 6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology*, v. 32, n. 2000, 2011.
- BLASCO, M. D.; ESTEVE, C.; ALCAIDE, E. Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, n. 2, p. 469–475, 2008.
- BOTT, T. R. Biofouling control in cooling water. *International Journal of Chemical Engineering*, 2009.
- BRACKMAN, G.; COENYE, T. Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 1, p. 5–11, 2014.
- BREIMAN, R. F. Impact of technology on the emergence of infectious-diseases. *Epidemiologic Reviews*, v. 18, n. 1, p. 4–9, 1996.
- BRIONES, A. M.; REICHARDT, W. Estimating microbial population counts by “most probable number” using Microsoft Excel®. *Journal of Microbiological Methods*, v. 35, n. 2, p. 157–161, 1999.

BROUSE, L.; BROUSE, R.; BROUSE, D. Natural Pathogen Control Chemistry to Replace Toxic Treatment of Microbes and Biofilm in Cooling Towers. *Pathogens*, v. 6, n. 2, p. 14, 2017.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, v. 8, n. 7, p. 1137–1144, 2006.

CACACE, D. et al. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies : A pan-European survey of urban settings. *Water Research*, v. 162, p. 320–330, 2019.

CAO, M.; MOORE, C. M.; HELMANN, J. D. *Bacillus subtilis* Paraquat Resistance Is Directed by an Extracytoplasmic Function Sigma Factor, and Is Conferred by YqjL and BcrC. v. 187, n. 9, 2005.

CHOI, D. H. et al. Bacterial diversity in biofilms formed on condenser tube surfaces in a nuclear power plant. *Biofouling*, v. 26, n. 8, p. 953–959, 2010.

CHUARD, C. et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* growing on fibronectin-coated surfaces to bactericidal antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 37, n. 4, p. 625–632, 1993.

CLOETE. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*, v. 9, n. Mic, p. 23–37, 1998.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M07-A11 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 2018.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M02-A13 Performance Standards for Antimicrobials Disk Susceptibility Tests. 2019.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M100 Performance Standards for Antimicrobial. 2020.

COETSER, S. E.; CLOETE, T. E. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 31, n. 4, p. 213–232, 2005.

Cooling Tower Fundamentals. 2011. Disponível em: <<http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b11510-14>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

CROFTS, T. S.; GASPARRINI, A. J.; DANTAS, G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews Microbiology*, v. 15, n. 7, p. 422–434, 2017.

CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; ZIELIN, M. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World J Microbiol Biotechnol* .2016.

D’COSTA, V. M. et al. Sampling the antibiotic resistome. *Science*, v. 311, n. 5759, p. 374–377, 2006.

D’COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, v. 477, n. 7365, p. 457–461, 2011.

DI PIPPO, F. et al. Biofilm growth and control in cooling water industrial systems. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 94, n. 5, p. 1–13, 2018.

DI GREGORIO, L. et al. Unravelling the core microbiome of biofilms in cooling tower systems. *Biofouling*, v. 33, n. 10, p. 793–806, 2017.

DIAS-SOUZA, M. V.; SOARES, D. L.; DOS SANTOS, V. L. Comparative study of free and liposome-entrapped chloramphenicol against biofilms of potentially pathogenic bacteria isolated from cooling towers. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 25, n. 7, p. 999–1004, 2017.

DOĞRUÖZ, N. et al. Biofilm formation on copper and galvanized steel surfaces in a cooling-water system. *IUFS Journal of Biology*, v. 68, n. 2, p. 105–111, 2009.

DOS SANTOS, V. L. et al. Reuse of refinery's tertiary-treated wastewater in cooling towers: microbiological monitoring. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 4, 2015.

DOYLE, J. DNA protocols for plants. *Mol. Techniques in Taxonomy*. vol 57. Springer, Berlin 1991.

ECKERT, R. B. Emphasis on biofilms can improve mitigation of microbiologically influenced corrosion in oil and gas industry. *Corrosion Engineering, Science and Technology*, v. 50, n. 3, p. 163–168, 2015.

ECONOMOU, V.; GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, v. 8, p. 49–61, 2015.

ESTRELA, C.; BARBIN, E. L.; PÉCORA, J. D. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. 2002.

EUCAST - EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Clinical breakpoints – bacteria. V 10.0. 2020.

EXNER, M. et al. Antibiotic resistance : What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria ? *Antibiotikaresistenz : Was ist so besonders an den Gram-negativen*. v. 12, p. 1–24, 2017.

FENG, L.; WU, Z.; YU, X. Quorum sensing in water and wastewater treatment biofilms. *J Environ Biol*, v. 34, n. 2 Spec No, p. 437–444, 2013.

FETZNER, S. Quorum quenching enzymes. *Journal of Biotechnology*, v. 201, p. 2–14, 2014.

FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

GOVINDASWAMY, A. et al. Multidrug resistant *Elizabethkingia meningoseptica* bacteremia – Experience from a level 1 trauma centre in India. v. 7, n. 3, p. 172–176, 2018.

GU, T. New Understandings of Biocorrosion Mechanisms and their Classifications. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, v. 04, n. 04, 2012.

GUARDABASSI, L.; LO FO WONG, D. M. A.; DALSGAARD, A. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Research*, v. 36, n. 8, 2002.

GUIMARÃES, T. M. Processo h₂O₂/uv seguido de osmose inversa para remoção de carbono orgânico dissolvido residual de efluente de refinaria de petróleo visando ao reuso. 2012. UFRJ, 2012.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.

HALLAM, N. et al. The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Research*, v. 35, n. 17, p. 4063–4071, 2001.

HAO, H. et al. Profiling of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in tap water. *Journal of Hazardous Materials*, v. 365, n. July 2018, p. 340–345, 2019.

HONG, P. Y. et al. Reusing treated wastewater: Consideration of the safety aspects associated with antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Water (Switzerland)*, v. 10, n. 3, 2018.

HOU, A. et al. Chlorine injury enhances antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through over expression of drug efflux pumps. *Water Research*, v. 156, p. 366–371, 2019.

IBAMA. Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. 2019. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

JE, V. et al. Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. p. 641–647, 2012.

JJEMBA, P. K. et al. Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 13, p. 4169–4178, 2010.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. Tratamento de esgotos domésticos. 7 ed ed. Rio de Janeiro: ABES, 2014.

KAPLAN, J. B. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, v. 89, n. 3, p. 205–218, 2010.

KIM, A. L. et al. Quorum quenching bacteria isolated from the sludge of a wastewater treatment plant and their application for controlling biofilm formation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 11, p. 1574–1582, 2014.

KIM, L. H. et al. Use of rhamnolipid biosurfactant for membrane biofouling prevention and cleaning. *Biofouling*, v. 31, n. 2, p. 211–220, 2015.

KIRBY, J. T. et al. Antimicrobial Susceptibility and Epidemiology of a Worldwide Collection of *Chryseobacterium* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997 – 2001). v. 42, n. 1, p. 445–448, 2004.

KNAPP, C. W. et al. Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940. v. 44, n. 2, p. 580–587, 2010.

KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. v. 37, n. 3, p. 311–320, 2010.

KUNIN, V. et al. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 72, n. 4, p. 557–578, 2008.

KURENBACH, B. et al. Herbicide ingredients change *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* and *Escherichia coli* antibiotic responses. p. 1791–1801, 2017.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J.-M.; BELOIN, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 78, n. 3, p. 510–543, 2014.

LEKUNBERRI, I.; BALCÁZAR, J. L.; BORREGO, C. M. Metagenomic exploration reveals a marked change in the river resistome and mobilome after treated wastewater discharges. *Environmental Pollution*, v. 234, p. 538–542, 2018.

- LIMA-BITTENCOURT, C. I. et al. Multiple antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* isolates from pristine freshwater. v. 6, n. 3, p. 510–521, 2007.
- LIN, W. et al. Can chlorination co-select antibiotic-resistance genes? *Chemosphere*, v. 156, 2016.
- LIU, C. X. et al. Modification of membrane surface for anti-biofouling performance: Effect of anti-adhesion and anti-bacteria approaches. *Journal of Membrane Science*, v. 346, n. 1, p. 121–130, 2010.
- LIU, S. S. et al. Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Research*, v. 136, p. 131–136, 2018.
- LIU, Y. et al. Role of bacterial adhesion in the microbial ecology of biofilms in cooling tower systems. *Biofouling*, v. 25, n. 3, p. 241–253, 2009.
- LIU, Y. et al. Disinfection of bacterial biofilms in pilot-scale cooling tower systems. *Biofouling*, v. 27, n. 4, p. 393–402, 2011.
- LLEWELLYN, A. C. et al. Distribution of *Legionella* and bacterial community composition among regionally diverse US cooling towers. p. 1–16, 2017.
- LUCCHESI, E. G. Influência de diferentes materiais na formação e susceptibilidade de biofilmes a agentes antimicrobianos. 2012. Universidade Estadual de Campinas, 2012.
- LUDENSKY, M. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 51, n. 4, p. 255–263, 2003.
- LUDENSKY, M. Microbiological control in cooling water systems. *Directory of Microbicides for the Protection of Materials*, p. 121–139, 2005.
- MACDONALD, R.; SANTA, M.; BRÖZEL, V. S. The response of a bacterial biofilm community in a simulated industrial cooling water system to treatment with an anionic dispersant. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, n. 2, p. 225–235, 2000.
- MAHMOOD, A. R.; AL-HAIDERI, H. H.; HASSAN, F. M. Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. v. 2019, 2019.
- MAINTINGUER, S. I. et al. EVALUATION OF THE MICROBIAL DIVERSITY OF DENITRIFYING BACTERIA IN BATCH REACTOR. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, n. 03, 2013.
- MANAIA, C. M. et al. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International*, v. 115, n. March, p. 312–324, 2018.
- MANYI-LOH, C. et al. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources : Potential Public Health Implications.
- MARTÍNEZ, J. L. Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process. *F1000Research*, v. 6, n. 0, p. 51, 2017.
- MCKELVEY, K. K.; BROOKE, M. *The Industrial Cooling Tower*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1959.
- MELO, I. S. De; AZEVEDO, J. L. De. *Microbiologia Ambiental*. 2. ed. Jaguaríuna: Embrapa, 2008.

- MEYER, S. T. Chlorine Use in Water Disinfection, Trihalomethane Formation, and Potential Risks to Public Health. v. 10, n. 1, p. 99–110, 1994.
- MIR, J.; MORATO, J.; RIBAS, F. Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains. p. 7–18, 1997.
- MOTTA, A. R. P. Da et al. Produced water treatment for oil removal by membrane separation process: review. Eng Sanit Ambient, v. 18, p. 15–26, 2013.
- NARCISO-DA-ROCHA, C.; VAZ-MOREIRA, I.; MANAIA, C. M. Diversity and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. in water from the source to the tap. 2012.
- NASCIMENTO, A. L. et al. Sewage Sludge Microbial Structures and Relations to Their Sources, Treatments, and Chemical Attributes. v. 9, n. July, p. 1–11, 2018.
- NUMBERGER, D. et al. Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. n. June, p. 1–14, 2019.
- O'NEAL, J.; GUILLEMOT, G. Online Monitoring of Biofilm in Cooling Tower Systems. In: The Analyst Technology Supplement. p. 36–42.
- OLIVEIRA, L. F. V. De; MARGIS, R. The Source of the River as a Nursery for Microbial Diversity. 2015.
- OSINSKA, A. et al. applied sciences Quantitative Occurrence of Antibiotic Resistance Genes among Bacterial Populations from Wastewater Treatment Plants Using Activated Sludge. 2019.
- OZ, T. et al. Strength of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution. Molecular Biology and Evolution, v. 31, n. 9, p. 2387–2401, 2014.
- PAGNIER, I.; MERCHAT, M.; SCOLA, B. La. Potentially pathogenic amoeba-associated microorganisms in cooling towers and their control. v. 4, p. 615–629, 2009.
- PAL, C. et al. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. BMC Genomics, p. 1–14, 2015.
- PAN-BR. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única. 2018.
- PANG, Y.-C. et al. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in a lake for the storage of reclaimed water before and after usage as cooling water. Environ. Sci.: Processes Impacts, v. 17, n. 6, p. 1182–1189, 2015.
- PAZDA, M. et al. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. Science of the Total Environment, v. 697, p. 134023, 2019.
- PEREIRA, R. P. A. et al. Bacterial community dynamics in a cooling tower with emphasis on pathogenic bacteria and *Legionella* species using universal and genus-specific deep sequencing. Water Research, v. 122, p. 363–376, 2017.
- PERES, F. A. S. et al. Tratamento de águas de refrigeração com peróxido de hidrogênio. Microbiologia (Madrid), v. 31, n. 7, p. 1851–1855, 2008.
- PINEL, I. S. M. et al. Bacterial community dynamics and disinfection impact in cooling water systems. Water Research, p. 115505, 2020.

PONNUSAMY, K. et al. Anti-biofouling property of vanillin on *Aeromonas hydrophila* initial biofilm on various membrane surfaces. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 9, 2013.

POTGIETER, S. et al. Long-term spatial and temporal microbial community dynamics in a large-scale drinking water distribution system with multiple disinfectant regimes. *Water Research*, 2018.

QIAO, C. Y.; CHAO, C. Inactivation of Resistant *Mycobacteria mucogenicum* in Water: Chlorine Resistance and Mechanism Analysis. *Biomedical and Environmental Sciences*, v. 25, n. 2, 2012.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015.

RAO, T. S. Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology*, v. 57, n. 1, p. 369–394, 2003.

RAVASI, D. et al. Effect of Powdered Activated Carbon as Advanced Step in Wastewater Treatments on Antibiotic Resistant Microorganisms. p. 63–75, 2019.

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physiochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull*, v. 36, n. 5, p. 347–355, 2011.

RIDGWAY, H f; OLSON, B h. Chlorine Resistance Patterns of Bacteria from Two Drinking Water Distribution Systems. v. 44, n. 4, p. 972–987, 1982.

ROBECK, G. G. Chlorine, is there a better alternative? *The Science of the Total Environment*, v. 18, 1981.

RODRIGUES, G. A. Identificação e espacialização das Sub-bacias de maior potencial erosivo, na Bacia Hidrográfica da lagoa de Ibitité–MG. 2004. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2004.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, v. 69, p. 234–242, 2015.

SAMIR, S. M. et al. Chemical Effect of Chlorination Process on Antibiotic Resistant Bacteria. v. 62, n. 2, p. 281–290, 2019.

SÁNCHEZ, M. B. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. v. 6, n. June, p. 1–7, 2015.

SANSEVERINO, I. et al. State of the Art on the Contribution of Water to Antimicrobial Resistance. Luxembourg. 2018.

SHI, P. et al. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Research*, v. 47, n. 1, p. 111–120, 2013.

SHIN, K. et al. Effects and side effects of penicillin injection in huanglongbing affected grapefruit trees. *Crop Protection*, v. 90, p. 106–116, 2016.

SHOKROLLAHZADEH, S.; AZIZMOHSENI, F.; GOLMOHAMMAD, F. Biodegradation potential and bacterial diversity of a petrochemical wastewater treatment plant in Iran. v. 99, p. 6127–6133, 2008.

SHRIVASTAVA, R. et al. Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. v. 58, p. 277–283, 2004.

SILVA-BEDOYA, L. M. et al. Bacterial community analysis of an industrial wastewater treatment plant in Colombia with screening for lipid-degrading microorganisms. *Microbiological Research*, v. 192, 2016.

SNIS - SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO. 24o Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos. 2019.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. 1999.

SUPRAM - superintendência regional de meio ambiente e desenvolvimento sustentável. Parecer único Supram - cm no 193/2008.

SZCZEPANOWSKI, R. et al. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. p. 2306–2319, 2009.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American Journal of medicine*, v. 119, n. 6 SUPPL. 1, 2006.

THANKI, G. H. Wastewater Make-up for cooling towers. *Everything about water*, n. April, p. 4–6, 2004.

TORVINEN, E. et al. Mycobacteria in Finnish cooling tower waters. *Apmis*, v. 122, n. 4, p. 353–358, 2014.

TSAO, H. et al. The cooling tower water microbiota: Seasonal dynamics and co-occurrence of bacterial and protist phylotypes. *Water Research*, v. 159, p. 464–479, 2019.

UTVIK, T. I. R.; NORSK. Chemical characterisation of produced water from four offshore oil production platforms in the north sea. v. 39, n. 15, p. 2593–2606, 1999.

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: Searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 38, n. 4, 2014.

VON SPERLING, Marcos. *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*, v.01. Minas Gerais: ABES, 1995.

WANG, J. et al. Bacterial community structure in cooling water and biofilm in an industrial recirculating cooling water system. *Water Science and Technology*, v. 68, n. 4, p. 940–947, 2013.

WEATHER SPARK. Condições meteorológicas médias de Betim. 2019.

WELLINGTON, E. M. H. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 13, n. 2, p. 155–165, 2013.

WESTPHAL-SETTELE, K. et al. The environment as a reservoir for antimicrobial resistance: A growing problem for public health? *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, v. 61, n. 5, p. 533–542, 2018.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on Surveillance of Antibiotic Consumption. 2018.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 214, n. 6, p. 417–423, 2011.

WU, B.; WANG, R.; FANE, A. G. The roles of bacteriophages in membrane-based water and wastewater treatment processes: A review. *Water Research*, v. 110, p. 120–132, 2017.

XU, P. et al. Chemical and electron microbial influenced corrosion. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 5, n. 12, p. 476–481, 2013.

YAMADA, T. Remediação de sedimentos eutróficos da Represa Ibirité (MG) pela adição de nitrato de Phoslock TM: experimentos em laboratório. p. 211, 2010.

YANG, Y. et al. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and. *Environment International*, v. 116, n. November 2017, p. 60–73, 2018.

YAO, S. et al. Bioresource Technology Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource Technology*, v. 127, p. 151–157, 2013.

ZHANG, Y. et al. Cell-free DNA: a neglected source for antibiotic resistance genes spreading from WWTPs Cell-free DNA: a neglected source for antibiotic resistance genes spreading from WWTPs. 2017.

ZHENG, C. et al. Treatment Technologies for Organic Wastewater: IntechOpen, 2013.

Anexo A – Tabela com valores de densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes a antimicrobianos, representadas em UFC/mL e NMP/mL com seus respectivos valores em \log_{10} .

	BHT – médias de repetições				Resistentes a antimicrobianos – médias de repetições (NMP/mL)							
	UFC/mL	log(UFC/mL)	NMP/mL	log(NMP/mL)	AMP	log(AMP)	CIP	log(CIP)	CRO	log(CRO)	ERI	log(ERI)
Coleta 1												
LI	$2,9 \cdot 10^5$	5,5	$3,4 \cdot 10^4$	4,5	$4,4 \cdot 10^2$	2,6	$4,1 \cdot 10^1$	1,6	$1,5 \cdot 10^2$	2,2	-	-
ES	$1,2 \cdot 10^6$	6,1	$2,9 \cdot 10^4$	4,5	-	-	-	-	$8,9 \cdot 10^1$	1,9	-	-
SS	$7,8 \cdot 10^4$	4,9	$7,9 \cdot 10^5$	5,9	$1,2 \cdot 10^4$	4,1	-	-	$7,7 \cdot 10^3$	3,9	-	-
ST	$4,8 \cdot 10^5$	5,7	$8,5 \cdot 10^3$	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-
BT	$4,0 \cdot 10^2$	2,6	$3,8 \cdot 10^3$	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Coleta 2												
LI	$8,7 \cdot 10^3$	3,9	$2,9 \cdot 10^3$	3,5	$1,6 \cdot 10^3$	3,2	$8,9 \cdot 10^1$	2,0	$3,5 \cdot 10^2$	2,5	$8,2 \cdot 10^2$	2,9
ES	$9,8 \cdot 10^3$	4,0	$2,2 \cdot 10^3$	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-
SS	$1,9 \cdot 10^4$	4,3	$7,9 \cdot 10^4$	4,9	$8,0 \cdot 10^2$	2,9	-	-	$9,0 \cdot 10^2$	3,0	$7,0 \cdot 10^2$	2,8
ST	$3,5 \cdot 10^2$	2,5	$4,1 \cdot 10^1$	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-
BT	$2,2 \cdot 10^4$	4,3	$5,6 \cdot 10^3$	3,7	$1,0 \cdot 10^3$	3,0	-	-	$8,8 \cdot 10^1$	1,9	$9,5 \cdot 10^1$	2,0

-: valor abaixo do limite de detecção da técnica (<5 NMP/mL).

LI: lagoa de captação; ES: efluente industrial; SS: saída do tratamento secundário; ST: saída do tratamento terciário; BT: bacia da torre de resfriamento.

AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacino; CRO: ceftriaxona; ERI: eritromicina

Anexo B – Resultados de Análise de Variância e agrupamento por teste Scott-Knott dos pontos amostrados, no teste de NMP e plaqueamento para a quantidade total de bactérias

Variável analisada: NMP TOTAL
Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
EPOCA	1	4.704500	4.704500	28.426	0.0003
PONTO	4	14.585000	3.646250	22.032	0.0001
EPOCA*PONTO	4	4.553000	1.138250	6.878	0.0063
erro	10	1.655000	0.165500		
Total corrigido	19	25.497500			
CV (%) =	10.50				
Média geral:	3.8750000	Número de observações:	20		

Teste Scott-Knott (1974) para a FV EPOCA

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
Erro padrão: 0,128646803302686

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	3.390000	a1
1	4.360000	a2

Teste Scott-Knott (1974) para a FV PONTO

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
Erro padrão: 0,20340845606808

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
ST	2.775000	a1
BT	3.375000	a1
ES	3.900000	a2
LI	3.975000	a2
SS	5.350000	a3

Análise do desdobramento de EPOCA dentro de cada nível de: PONTO

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
EPOCA	/LI 1	1.102500	1.102500	6.662	0.0274
EPOCA	/ES 1	1.210000	1.210000	7.311	0.0222
EPOCA	/SS 1	1.000000	1.000000	6.042	0.0338
EPOCA	/ST 1	5.522500	5.522500	33.369	0.0002
EPOCA	/BT 1	0.422500	0.422500	2.553	0.1412
Erro	10	1.655000	0.165500		

Variável analisada: UFC
 Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
EPOCA	1	6.728000	6.728000	480.571	0.0000
PONTO	4	5.988000	1.497000	106.929	0.0000
EPOCA*PONTO	4	13.532000	3.383000	241.643	0.0000
erro	10	0.140000	0.014000		
Total corrigido	19	26.388000			
CV (%) =	2.71				
Média geral:	4.3600000	Número de observações:	20		

Teste Scott-Knott (1974) para a FV EPOCA

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
 Erro padrão: 0,0374165738677394

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	3.780000	a1
1	4.940000	a2

Teste Scott-Knott (1974) para a FV PONTO

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 0,0591607978309962

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
BT	3.450000	a1
ST	4.075000	a2
SS	4.575000	a3
LI	4.675000	a3
ES	5.025000	a4

Análise do desdobramento de EPOCA dentro de cada nível de: PONTO

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
EPOCA	/LI 1	2.402500	2.402500	171.607	0.0000
EPOCA	/ES 1	4.622500	4.622500	330.179	0.0000
EPOCA	/SS 1	0.422500	0.422500	30.179	0.0003
EPOCA	/ST 1	9.922500	9.922500	708.750	0.0000
EPOCA	/BT 1	2.890000	2.890000	206.429	0.0000
Erro	10	0.140000	0.014000		

Anexo C – Resultados de Análise de Variância e agrupamento por teste Scott-Knott dos pontos amostrados, no teste de NMP para a quantidade de bactérias resistentes a Eritromicina, Ampicilina, Ciprofloxacino e Ceftriaxona

 Variável analisada: ERI
 Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PONTO	2	1.213333	0.606667	6.500	0.0812
erro	3	0.280000	0.093333		
Total corrigido	5	1.493333			
CV (%) =	12.06				
Média geral:	2.533333	Número de observações:		6	

Teste Scott-Knott (1974) para a FV PONTO

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 2
 Erro padrão: 0,216024689946929

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
BT	1.900000	a1
SS	2.800000	a1
LI	2.900000	a1

 Variável analisada: AMP
 Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
EPOCA	1	1.104500	1.104500	1.610	0.2252
PONTO	4	41.330000	10.332500	15.064	0.0001
erro	14	9.603000	0.685929		
Total corrigido	19	52.037500			
CV (%) =	52.58				
Média geral:	1.5750000	Número de observações:		20	

Teste Scott-Knott (1974) para a FV EPOCA

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
 Erro padrão: 0,261902380941558

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.340000	a1
2	1.810000	a1

Teste Scott-Knott (1974) para a FV PONTO

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4

Erro padrão: 0,414104024198199

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
ST	0.000000 a1	
ES	0.000000 a1	
BT	1.500000 a2	
LI	2.900000 a3	
SS	3.475000 a3	

Variável analisada: CIP

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
EPOCA	1	0.032000	0.032000	3.500	0.0824
PONTO	4	10.368000	2.592000	283.500	0.0000
erro	14	0.128000	0.009143		
Total corrigido	19	10.528000			
CV (%) =	26.56				
Média geral:	0.3600000	Número de observações:	20		

Teste Scott-Knott (1974) para a FV EPOCA

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10

Erro padrão: 0,0302371578407382

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.320000 a1	
2	0.400000 a1	

Teste Scott-Knott (1974) para a FV PONTO

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4

Erro padrão: 0,0478091443733757

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
ST	0.000000 a1	
SS	0.000000 a1	
BT	0.000000 a1	
ES	0.000000 a1	
LI	1.800000 a2	

Variável analisada: CRO

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
EPOCA	1	0.098000	0.098000	0.170	0.6865
PONTO	4	29.227000	7.306750	12.665	0.0001
erro	14	8.077000	0.576929		
Total corrigido	19	37.402000			

 CV (%) = 49.64
 Média geral: 1.5300000 Número de observações: 20

 Teste Scott-Knott (1974) para a FV EPOCA

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
 Erro padrão: 0,240193374477435

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.460000	a1
1	1.600000	a1

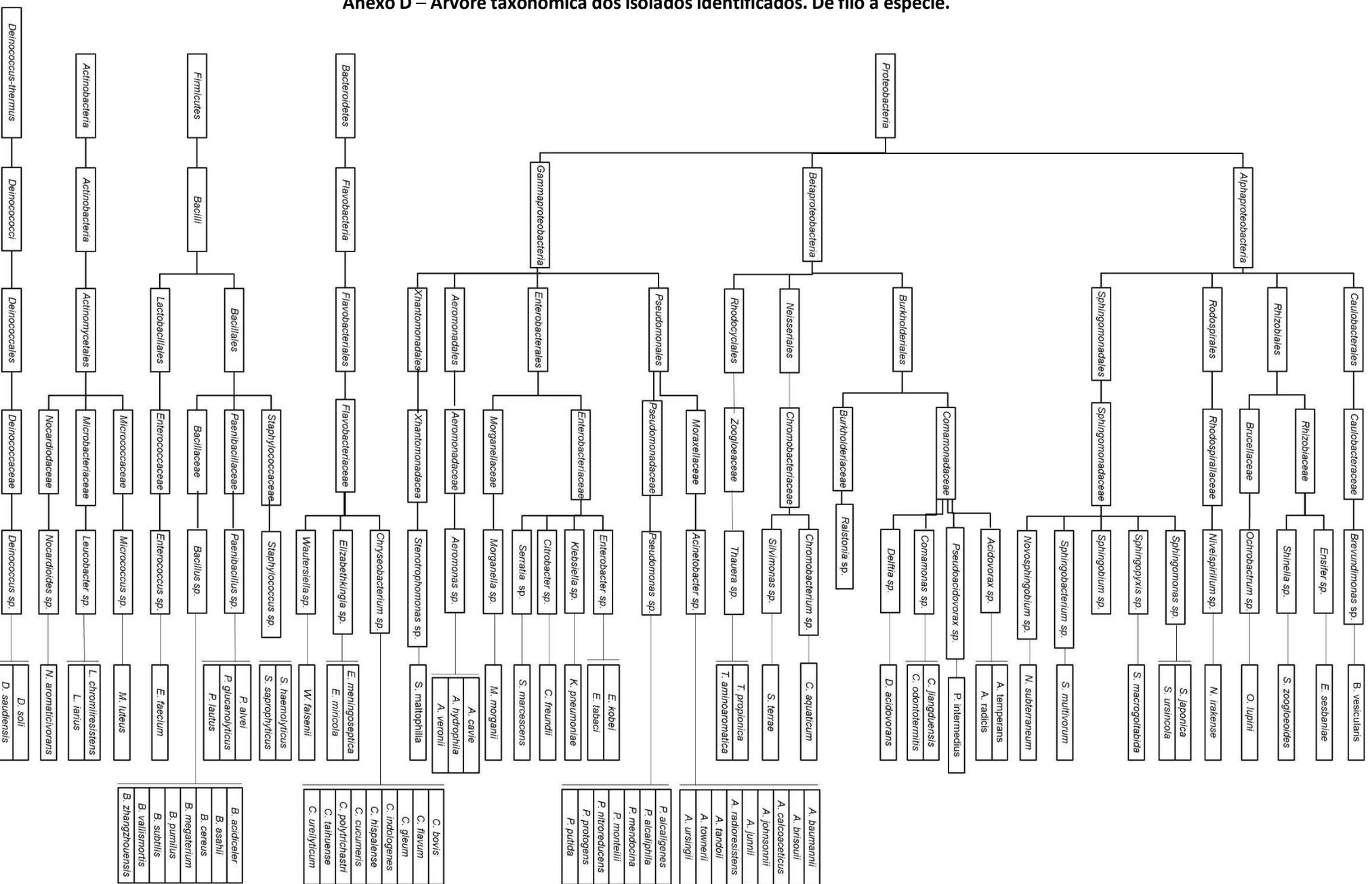
 Teste Scott-Knott (1974) para a FV PONTO

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 0,379779071115225

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
ST	0.000000	a1
BT	0.925000	a1
ES	0.950000	a1
LI	2.350000	a2
SS	3.425000	a2

Anexo D – Árvore taxonômica dos isolados identificados. De filo a espécie.



Anexo E- Tabela com códigos, locais de coleta e identificações, por MALDI-ToF ou sequenciamento do 16s, dos isolados.

Coleta e local	ID	Identificação	Score/Similaridade	Código de acesso GenBank
1BT	M1	<i>Acidovorax temperans</i>	99,70%	NR_028715
1BT	M2	<i>Thauera</i> sp.	92,50%	NR_024972
2BT	M3	<i>Bacillus subtilis</i>	1.930	
2BT	M4	<i>Bacillus vallismortis</i>	1.913	
2BT	M5	não identificado		
2BT	M6	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2.251	
2BT	M7	não identificado		
2BT	M8	<i>Staphylococcus</i> sp.	90,20%	KF543100
1SS	M9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.094	
1SS	M10	<i>Leucobacter</i> sp.	99,40%	NR_042414
1SS	M11	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.829	
1SS	M12	<i>Ochrobactrum</i> sp.	99,80%	NR_042911
1LI	M13	<i>Pseudomonas</i> sp.	2.251	
1ST	M14	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.232	
1ST	M15	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.304	
1ST	M16	<i>Chryseobacterium</i> sp.	99,90%	NR_156145
1ST	M17	<i>Ensifer</i> sp.	98,30%	NR_133053
1ST	M18	<i>Bacillus cereus</i>	2.128	
1ST	M19	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,50%	NR_041577
1ST	M20	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.301	
1ST	M21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,60%	NR_041577
2ST	M22	<i>Bacillus</i> sp.	99,50%	MN658823
2ST	M23	não identificado		
2ST	M24	<i>Pseudomonas monteilii</i>	2.105	
2ST	M25	não identificado		
2ST	M26	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.177	
2ST	M27	<i>Bacillus cereus</i>	2.087	
2ST	M28	não identificado		
2ST	M29	não identificado		
1ES	M30	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.674	
1ES	M31	<i>Micrococcus luteus</i>	2.018	
2ES	M32	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.518	
2SS	M33	<i>Bacillus</i> sp.	1.997	
2SS	M34	<i>Serratia marcescens</i>	2.166	
2SS	M35	<i>Bacillus pumilus</i>	2.020	
2SS	M36	<i>Wautersiella</i> sp.	96,30%	NR_146029
1ES	M37	<i>Chryseobacterium</i> sp.	97,10%	NR_134710
1ES	M38	<i>Acinetobacter tandoii</i>	2.079	
1ES	M39	não identificado		
1ES	M40	<i>Comamonas</i> sp.	99,70%	NR_109655
1ES	M41	<i>Acinetobacter</i> sp.	98%	NR_117630

Coleta e local	ID	Identificação	Score/Similaridade	Código de acesso GenBank
1ES	M42	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1.828	
1ES	M43	não identificado		
1ES	M44	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.372	
1SS	M45	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2.002	
1SS	M46	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.245	
1SS	M47	<i>Serratia marcescens</i>	2.285	
1SS	M48	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.282	
1SS	M49	<i>Bacillus cereus</i>	2.186	
1SS	M50	<i>Leucobacter</i> sp.	98,40%	NR_042414
1SS	M51	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.287	
1SS	M52	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2.414	
1SS	M53	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	96,00%	OKX015714
1SS	M54	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.294	
1SS	M55	<i>Serratia marcescens</i>	2.269	
1SS	M56	<i>Bacillus</i> sp.	1.943	
1SS	M57	<i>Leucobacter</i> sp.	98,90%	NR_117509
1SS	M58	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.653	
1ST	M59	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.839	
1ST	M60	não identificado		
1ST	M61	<i>Sphingomonas</i> sp.	1.897	
1ST	M62	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2.297	
1ST	M63	<i>Chryseobacterium</i> sp.	97,20%	NR_134710
1ST	M64	<i>Bacillus cereus</i>	2.092	
1ST	M65	não identificado		
1LI	M66	<i>Deinococcus</i> sp.	100%	NR_146666
1LI	M67	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1.926	
1LI	M68	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1.995	
1LI	M69	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2.254	
1LI	M70	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.475	
1LI	M71	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2.451	
1LI	M72	não identificado		
1LI	M73	<i>Enterobacter</i> sp.	2.034	
1LI	M74	<i>Sphingomonas</i> sp.	1.707	
2LI	M75	não identificado		
2LI	M76	não identificado		
2LI	M77	<i>Bacillus</i> sp.	1.847	
2LI	M78	<i>Bacillus</i> sp.	1.950	
2LI	M79	<i>Chryseobacterium</i> sp.	97,40%	NR_044166
2LI	M80	<i>Chryseobacterium</i> sp.	97,30%	NR_115957
2LI	M81	não identificado		
2LI	M82	<i>Bacillus</i> sp.	99,70%	NR_043774
2LI	M83	<i>Chryseobacterium</i> sp.	99,90%	NR_156145
2LI	M84	<i>Bacillus asahii</i>	1.702	
2LI	M85	<i>Nocardioides</i> sp.	98,20%	NR_040938

2LI	M86	<i>Bacillus megaterium</i>	1.985	
2SS	M87	<i>Bacillus cereus</i>	2.018	
Coleta e local	ID	Identificação	Score/Similaridade	Código de acesso GenBank
2SS	M88	<i>Comamonas</i> sp.	99,70%	NR_043859
2SS	M89	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.244	
2SS	M90	não identificado		
2SS	M91	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.054	
2SS	M92	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.119	
2SS	M93	<i>Silvimonas</i> sp.	97%	NR_113961
2SS	M94	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.192	
2SS	M95	<i>Serratia marcescens</i>	2.270	
2SS	M96	<i>Aeromonas</i> sp.	99,80%	NR_119190
2ST	M97	<i>Acinetobacter</i> sp.	93,70%	KT444587
2ST	M98	<i>Pseudomonas</i> sp.	96,10%	NR_114957
2ST	M99	<i>Pseudomonas putida</i>	1.762	
2ST	M100	não identificado		
2ST	M101	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.724	
2ST	M102	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2.277	
2ST	M103	<i>Ensifer</i> sp.	97,70%	NR_133053
2ST	M104	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.715	
2ST	M105	<i>Sphingomonas</i> sp.	1.993	
2ST	M106	<i>Ensifer</i> sp.	99,00%	NR_133053
2ST	M107	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.424	
2ES	M108	<i>Bacillus cereus</i>	2.196	
2ES	M109	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1.799	
2ES	M110	<i>Acinetobacter tandoii</i>	2.018	
2ES	M111	<i>Acinetobacter tandoii</i>	1.864	
2ES	M112	<i>Acinetobacter junii</i>	1.728	
2ES	M113	não identificado		
2ES	M114	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,60%	NR_041577
2ES	M115	<i>Acinetobacter tandoii</i>	2.113	
2ES	M116	não identificado		
2SS	M117	<i>Acinetobacter</i> sp.	92,30%	KY616668
1BT	M118	<i>Bacillus cereus</i>	2.095	
1BT	M119	<i>Pseudomonas mendocina</i>	2.085	
1BT	M120	não identificado		
2BT	M121	<i>Paenibacillus alvei</i>	1.756	
1LI	M122	não identificado		
1LI	M123	<i>Novosphingobium</i> sp.	98,30%	NR_113838
1LI	M124	<i>Acinetobacter</i> sp.	97,30%	MK875784
1LI	M125	<i>Chryseobacterium</i> sp.	97,30%	NR_115957
1LI	M126	não identificado		
1LI	M127	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1.947	
1LI	M128	<i>Acidovorax temperans</i>	2.302	
1LI	M129	<i>Acinetobacter</i> sp.	1.595	

1LI	M130	<i>Acidovorax</i> sp.	1.829	
1LI	M131	<i>Acidovorax temperans</i>	2.228	
1LI	M132	<i>Acinetobacter</i> sp.	1.569	
Coleta e local	ID	Identificação	Score/Similaridade	Código de acesso GenBank
1LI	M133	<i>Citrobacter freundii</i>	2.285	
1LI	M134	não identificado		
1LI	M135	<i>Enterococcus faecium</i>	2.349	
1LI	M136	<i>Bacillus</i> sp.	99,70%	NR_148786
1LI	M137	<i>Sphingomonas</i> sp.	98,30%	NR_041681
1LI	M138	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98,90%	NR_041577
1LI	M139	não identificado		
1LI	M140	<i>Acinetobacter</i> sp.	1.396	
1LI	M141	<i>Pseudomonas</i> sp.	2.068	
1LI	M142	<i>Pseudoacidovorax</i> sp.	99,80%	NR_044241
1LI	M143	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2.225	
1LI	M144	não identificado		
1LI	M145	<i>Morganella morganii</i>	2.528	
1LI	M146	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,70%	NR_041577
1LI	M147	não identificado		
1LI	M148	<i>Shinella</i> sp.	98,80%	NR_119062
1LI	M149	<i>Sphingobium</i> sp.	76%	NR_115524
1LI	M150	<i>Pseudomonas protegens</i>	2.138	
1LI	M151	<i>Niveispirillum</i> sp.	98,90%	NR_117480
1LI	M152	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.372	
1LI	M153	<i>Acinetobacter</i> sp.	1.346	
1LI	M154	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.533	
1LI	M155	não identificado		
1LI	M156	não identificado		
1LI	M157	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.882	
1LI	M158	não identificado		
1LI	M159	<i>Wautersiella falsenii</i>	2.199	
1LI	M160	<i>Acinetobacter</i> sp.	99,10%	NR_115871
1LI	M161	não identificado		
1LI	M162	<i>Acinetobacter</i> sp.	1.698	
1LI	M163	<i>Acidovorax</i> sp.	1.576	
2ST	M165	<i>Acinetobacter ursingii</i>	1.979	
2ST	M166	<i>Deinococcus</i> sp.	98,60%	NR_153717
2ST	M167	<i>Acidovorax</i> sp.	1.520	
2ST	M168	<i>Bacillus pumilus</i>	1.915	
ES	M169	<i>Paenibacillus</i> sp.	99,10%	NR_115599
ES	M170	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.230	
ES	M171	<i>Paenibacillus</i> sp.	99,20%	NR_117185
ES	M172	não identificado		
ES	M173	não identificado		
ES	M174	<i>Thauera</i> sp.	99,80%	NR_159313

ES	M175	<i>Thauera</i> sp.	99,40%	NR_027211
ES	M176	<i>Paenibacillus</i> sp.	99,40%	NR_115599
ES	M177	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	1.942	
2BT	M178	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2.020	
Coleta e local	ID	Identificação	Score/Similaridade	Código de acesso GenBank
2BT	M179	<i>Sphingomonas</i> sp.	99,60%	NR_040825
2BT	M180	<i>Ralstonia</i> sp.	96,40%	NR_044040
2BT	M181	<i>Pseudomonas mendocina</i>	1.839	
2BT	M182	<i>Acidovorax</i> sp.	98,10%	NR_028715
2BT	M183	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	2.161	
2BT	M184	<i>Bacillus</i> sp.	99,90%	NR_148786
2BT	M185	<i>Acidovorax temperans</i>	1.920	
2BT	M186	<i>Chryseobacterium</i> sp.	97,80%	NR_116277
2BT	M187	não identificado		
2BT	M188	<i>Acidovorax temperans</i>	2.121	
2BT	M189	<i>Acidovorax temperans</i>	2.018	
2BT	M190	não identificado		
1BT	M191	não identificado		
1BT	M192	<i>Acidovorax temperans</i>	2.090	
1BT	M193	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.321	
1BT	M194	<i>Ralstonia</i> sp.	96,80%	NR_044040
1BT	M195	<i>Acidovorax</i> sp.	99,70%	NR_117776
1BT	M196	<i>Pseudomonas mendocina</i>	2.057	
1BT	M197	<i>Pseudomonas mendocina</i>	2.103	
1BT	M198	<i>Acidovorax temperans</i>	2.261	
1BT	M199	<i>Sphingopyxis</i> sp.	99,70%	NR_115617
1BT	M200	<i>Acidovorax temperans</i>	2.283	
1BT	M201	<i>Acidovorax</i> sp.	99,70%	NR_028715
1SS	M202	<i>Serratia marcescens</i>	2.254	
1SS	M203	não identificado		
1SS	M204	não identificado		
1SS	M205	não identificado		
1SS	M206	<i>Chryseobacterium gleum</i>	2.038	
1SS	M207	<i>Shinella</i> sp.	92%	NR_152074
1SS	M208	<i>Acinetobacter</i> sp.	1.911	
1SS	M209	<i>Serratia</i> sp.	1.706	
1SS	M210	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.277	
1SS	M211	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	2.217	
1SS	M212	<i>Delftia acidovorans</i>	2.389	
1SS	M213	<i>Elizabethkingia miricola</i>	1.976	
1SS	M214	<i>Chromobacterium</i> sp.	98,70%	NR_044405
1SS	M215	não identificado		
2SS	M216	<i>Aeromonas veronii</i>	2.048	
2SS	M217	não identificado		
2SS	M218	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.967	

2SS	M219	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2.041	
2SS	M220	<i>Chryseobacterium</i> sp.	98,40%	NR_042503
2SS	M221	não identificado		
2SS	M222	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.308	
2SS	M223	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.497	
Coleta e local	ID	Identificação	Score/Similaridade	Código de acesso GenBank
2SS	M224	não identificado		
2SS	M225	não identificado		
2SS	M226	não identificado		
1ES	M227	não identificado		
1ST	M228	não identificado		
1ST	M229	<i>Bacillus pumilus</i>	1.915	
1ST	M230	<i>Bacillus pumilus</i>	1.969	
1ST	M231	não identificado		
2LI	M232	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1.942	
2LI	M233	não identificado		
2LI	M234	não identificado		
2LI	M235	não identificado		
2LI	M236	<i>Enterobacter</i> sp.	99,40%	NR_146667
2LI	M237	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	95,10%	NR_041577
2LI	M238	<i>Bacillus pumilus</i>	1.946	
2LI	M239	<i>Acinetobacter towneri</i>	1.725	
2LI	M240	<i>Acinetobacter</i> sp.	1.619	
2LI	M241	<i>Chryseobacterium</i> sp.	98,30%	NR_109542
2LI	M242	<i>Bacillus pumilus</i>	1.724	
2LI	M243	<i>Aeromonas caviae</i>	2.099	
2LI	M244	<i>Acinetobacter</i> sp.	1.438	
2LI	M245	não identificado		
2LI	M246	<i>Enterobacter kobei</i>	2.061	

Anexo F – Tabelas com resultados de suscetibilidade aos antibióticos testados por microdiluição e disco difusão. Campos cinza escuro representam valores maiores que o ponto de corte (resistente), cinza claro representa valores para resistência intermediária.

ID	Local	Identificação	Concentração inibitória mínima (CIM mg/L)						Disco difusão - halo de inibição (mm)				
			Cloro	AMP	TET	CIP	CRO	GEN	IMI	CIP	CRO	SUT	CLO
M34	1SS	<i>Serratia marcescens</i>	50	128	2	≤0,06	1	21	0	32	28	24	17
M47	1SS	<i>Serratia marcescens</i>	>100	8	4	≤0,06	2	18	20	29	27	26	20
M55	1SS	<i>Serratia marcescens</i>	3,12	1	2	≤0,06	≤0,06	18	21	14	21	0	24
M73	1LI	<i>Enterobacter</i> sp.	>100	64	≤0,25	≤0,06	2	18	22	31	24	25	22
M95	1SS	<i>Serratia marcescens</i>	≤1,56	16	4	≤0,06	1	20	24	33	28	24	23
M133	2LI	<i>Citrobacter freundii</i>	3,12	64	32	≤0,25	≤1	18	25	30	29	27	24
M145	2LI	<i>Morganella morganii</i>	≤1,56	64	≤1	≤0,25	4	19	23	39	35	29	24
M152	2LI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≤1,56	8	16	≤0,25	4	19	27	25	28	20	24
M202	2SS	<i>Serratia marcescens</i>	≤1,56	>64	16	≤0,25	16	21	23	27	28	26	17
M209	2SS	<i>Serratia marcescens</i>	12,5	16	4	≤0,25	≤1	25	29	38	33	33	33
M236	2LI	<i>Enterobacter</i> sp.	>100	≤1	≤0,5	0,25	1	21	40	25	40	32	40
M246	2LI	<i>Enterobacter kobei</i>	12,5	2	≤1	≤0,25	≤1	17	21	33	24	25	17
<i>Aeromonas</i> sp.			Cloro	AMP	TET	CIP	CRO	GEN	IMI	CIP	CAZ	SUT	CLO
M46	1SS	<i>Aeromonas hydrophila</i>	100	256	≤0,25	≤0,06	0,12	20	15	38	17	22	27
M89	1SS	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3,12	256	≤0,25	≤0,06	0,5	21	16	32	22	22	30
M94	1SS	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3,12	≤0,5	≤0,25	≤0,06	0,25	19	17	32	29	15	26
M96	1SS	<i>Aeromonas caviae</i>	6,25	8	2	2	>8	17	40	12	22	28	15
M127	2LI	<i>Aeromonas hydrophila</i>	>100	>64	≤1	≤0,25	≤0,25	19	21	28	25	23	27
M154	2LI	<i>Aeromonas hydrophila</i>	>100	-	-	-	-	19	18	37	30	30	35
M216	2SS	<i>Aeromonas veronii</i>	>100	≤0,5	≤1	≤0,25	≤0,25	20	35	35	30	29	32
M222	2SS	<i>Aeromonas hydrophila</i>	25	>64	≤1	≤0,25	≤0,25	20	17	30	26	19	30
M223	2SS	<i>Aeromonas hydrophila</i>	6,25	-	-	-	-	20	20	32	26	19	30
M243	2LI	<i>Aeromonas caviae</i>	≤1,56	-	-	-	-	20	21	27	27	19	29
<i>Acinetobacter</i> sp.			Cloro		TET	CIP	CRO	GEN	IMI	CIP	CAZ	SUT	
M38	1ES	<i>Acinetobacter</i> sp.	25		≤0,25	≤0,06	≤1	20	28	28	17	20	
M41	1ES	<i>Acinetobacter</i> sp.	≤1,56		≤0,5	≤0,12	≤2	17	27	24	16	18	
M42	1ES	<i>Acinetobacter</i> sp.	12,5		≤1	≤0,25	≤0,25	16	33	22	0	20	

ID	Local	Identificação	Concentração inibitória mínima (CIM mg/L)					Disco difusão - halo de inibição (mm)			
			Cloro	TET	CIP	CRO	GEN	IMI	CIP	CAZ	SUT
M67	1LI	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	6,25	≤0,25	≤0,06	>128	19	27	22	14	19
M68	1LI	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	100	≤0,25	≤0,06	16	22	40	27	18	27
M69	1LI	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	12,5	≤1	≤0,25	≤1	18	24	27	17	12
M71	1LI	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	>100	≤0,25	≤0,06	≤0,25	20	36	30	17	30
M97	1ST	<i>Acinetobacter sp.</i>	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-
M109	1ES	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	≤1,56	≤0,25	≤0,25	-	24	40	30	29	30
M110	1ES	<i>Acinetobacter tandoii</i>	3,12	2	≤0,06	2	17	27	25	18	18
M111	1ES	<i>Acinetobacter tandoii</i>	25	≤0,25	≤0,06	≤1	21	27	25	18	0
M112	1ES	<i>Acinetobacter junii</i>	≤1,56	≤0,25	≤0,06	≤1	18	32	25	17	14
M115	1ES	<i>Acinetobacter tandoii</i>	12,5	≤0,25	≤0,06	≤1	21	17	16	18	13
M117	1SS	<i>Acinetobacter sp.</i>	12,5	≤0,5	≤0,12	32	20	30	25	15	20
M124	2LI	<i>Acinetobacter sp.</i>	12,5	≤0,5	>8	≤2	18	40	0	0	30
M129	2LI	<i>Acinetobacter sp.</i>	100	≤1	≤0,25	2	18	30	25	14	18
M132	2LI	<i>Acinetobacter sp.</i>	>100	≤1	≤0,25	2	19	33	23	16	20
M140	2LI	<i>Acinetobacter sp.</i>	6,25	≤1	≤0,25	0,5	18	30	24	10	18
M143	2LI	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	>100	≤1	≤0,25	≤1	20	30	25	13	24
M153	2LI	<i>Acinetobacter sp.</i>	-	≤1	≤0,25	≤1	18	27	23	18	23
M160	2LI	<i>Acinetobacter sp.</i>	3,25	≤0,5	8	128	17	30	23	14	15
M162	2LI	<i>Acinetobacter sp.</i>	3,12	≤1	≤0,25	2	20	39	24	18	22
M165	2ST	<i>Acinetobacter ursingii</i>	25	≤1	≤0,25	0,5	25	25	35	0	23
M170	2ES	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3,12	≤1	≤0,25	8	16	30	23	15	26
M208	2SS	<i>Acinetobacter sp.</i>	6,25	≤1	>64	≤1	20	35	29	17	25
M239	2LI	<i>Acinetobacter townnerii</i>	6,25	≤1	>64	≤1	21	32	26	16	27
M240	2LI	<i>Acinetobacter sp.</i>	6,25	≤1	≤0,25	≤0,25	-	-	-	-	-
M241	2LI	<i>Acinetobacter sp.</i>	>100	≤1	≤0,25	2	17	32	26	17	24
M244	2LI	<i>Acinetobacter sp.</i>	>100	≤1	≤0,25	2	17	24	22	11	26
BGN não-enterobactérias			Cloro	CLO	TET	CIP	CRO	GEN	IMI	CIP	CAZ
M1	1BT	Acidovorax	6,25	-	-	-	-	-	-	-	-
M2	1BT	Thauera	>100	-	-	-	-	-	-	-	-
M9	1SS	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3,12	2	4	2	128	0	17	15	0

ID	Local	Identificação	Concentração inibitória mínima (CIM mg/L)					Disco difusão - halo de inibição (mm)			
			BGN não-enterobactérias	Cloro	CLO	TET	CIP	CRO	GEN	IMI	CIP
M11	1SS	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	≤1,56	32	8	≤0,06	64	7	9	26	0
M12	1SS	<i>Ochrobactrum</i> sp.	≤1,56	4	≤0,5	≤0,12	16	18	24	25	0
M13	1LI	<i>Pseudomonas</i> sp.	≤1,56	8	≤0,25	≤0,06	≤1	18	30	27	21
M14	1ST	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	25	≤2	4	≤0,25	16	0	16	8	14
M16	1ST	<i>Chryseobacterium</i> sp.	≤1,56	32	2	≤0,12	32	0	20	28	18
M17	1ST	<i>Ensifer</i> sp.	3,12	4	4	2	32	13	22	13	22
M21	1ST	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12,5	2	4	2	128	0	20	18	18
M24	1ST	<i>Pseudomonas monteilii</i>	6	4	≤0,25	≤0,06	2	20	32	27	22
M26	1ST	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	50	4	≤1	≤0,25	2	20	20	25	19
M32	1ES	<i>Pseudomonas</i> sp.	50	-	-	-	-	-	-	-	-
M36	1SS	<i>Wautersiella</i> sp.	6,25	16	2	>8	64	17	40	10	0
M37	1ES	<i>Chryseobacterium</i> sp.	>100	16	4	4	128	9	18	23	12
M40	1ES	<i>Comamonas</i> sp.	3,12	32	1	4	16	18	37	12	0
M44	1ES	<i>Pseudomonas</i> sp.	25	16	16	≤0,25	64	19	16	27	19
M45	1SS	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	100	≤2	8	0,12	1	21	13	34	25
M48	1SS	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	≤1,56	≤2	4	≤0,25	16	0	0	15	21
M51	1SS	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	100	4	8	2	≤1	0	17	17	13
M52	1SS	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	12,5	4	≤0,25	≤0,06	>128	11	0	29	0
M53	1SS	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	≤1,56	≤1	2	≤0,12	32	0	20	20	21
M54	1SS	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	≤1,56	2	4	≤0,12	64	0	19	20	22
M58	1SS	<i>Pseudomonas</i> sp.	3,12	≤2	≤1	≤0,25	≤1	22	35	29	23
M59	1ST	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	≤2	≤0,25	≤0,06	≤1	24	36	14	20
M61	1ST	<i>Sphingomonas</i> sp.	6,25	≤2	2	≤0,25	≤1	23	37	13	0
M62	1ST	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	>100	16	≤1	≤0,25	>64	25	30	20	0
M63	1ST	<i>Chryseobacterium</i> sp.	3,12	4	2	≤0,12	32	16	19	20	22
M70	1LI	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	100	≤2	≤1	≤0,25	≤1	20	30	25	19

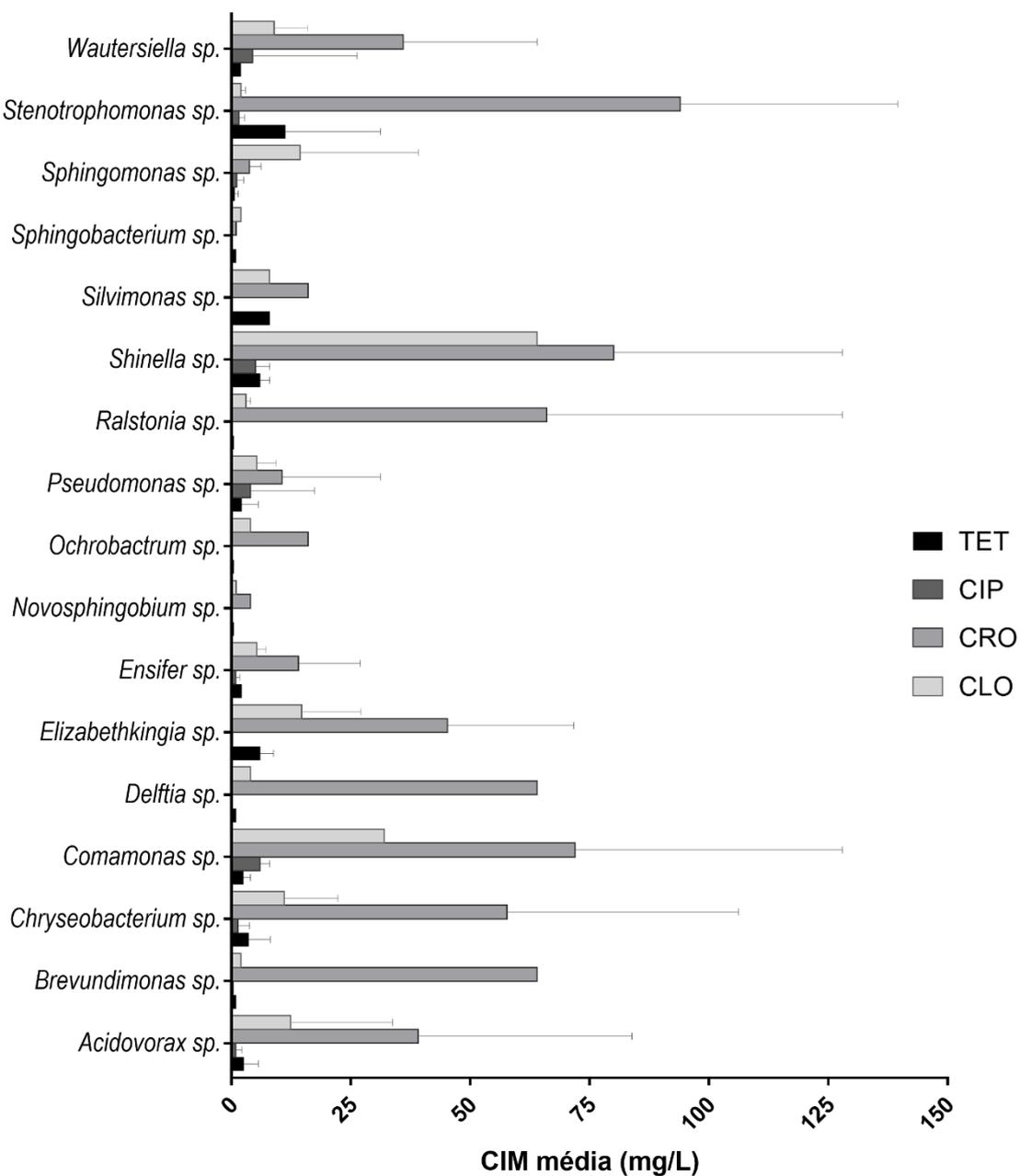
ID	Local	Identificação	Concentração inibitória mínima (CIM mg/L)						Disco difusão - halo de inibição (mm)		
			BGN não-enterobactérias	Cloro	CLO	TET	CIP	CRO	GEN	IMI	CIP
M74	1LI	<i>Sphingomonas</i> sp.	100	>64	≤0,25	0,5	8	27	35	16	0
M79	1LI	<i>Chryseobacterium</i> sp.	50	≤1	≤0,5	≤0,12	16	-	-	-	-
M80	1LI	<i>Chryseobacterium</i> sp.	50	-	-	-	-	-	-	-	-
M83	1LI	<i>Chryseobacterium</i> sp.	>100	-	4	2	-	0	17	24	0
M88	1SS	<i>Comamonas</i> sp.	50	32	4	8	128	13	20	16	17
M91	1SS	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	3,12	4	4	64	≤1	19	42	0	0
M92	1SS	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3,12	≤1	4	0,5	128	0	20	14	15
M93	1SS	<i>Silvimonas</i> sp.	25	8	8	2	16	0	17	16	0
M98	1ST	<i>Pseudomonas</i> sp.	1,56	4	≤0,5	≤0,12	≤2	22	37	22	13
M99	1ST	<i>Pseudomonas putida</i>	3,12	8	≤0,25	≤0,06	≤1	20	29	15	13
M101	1ST	<i>Pseudomonas</i> sp.	6,25	8	≤0,25	≤0,06	≤1	20	18	11	0
M102	1ST	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	3,12	8	≤0,25	≤0,06	4	21	38	34	13
M103	1ST	<i>Ensifer</i> sp.	3,12	8	≤0,5	≤0,12	≤2	17	35	0	0
M104	1ST	<i>Pseudomonas</i> sp.	12,5	8	≤0,25	≤0,06	2	23	39	28	23
M105	1ST	<i>Sphingomonas</i> sp.	3,12	≤2	≤0,25	0,5	4	23	36	18	0
M106	1ST	<i>Ensifer</i> sp.	25	4	2	0,5	8	0	24	13	21
M107	1ST	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	12,5	≤2	≤1	≤0,25	4	24	36	34	25
M114	1ES	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	50	2	4	2	128	0	20	15	0
M119	1BT	<i>Pseudomonas mendocina</i>	>100	≤2	4	2	2	20	40	37	35
M123	2LI	<i>Novosphingobium</i> sp.	≤1,56	≤1	≤0,5	2	4	25	40	14	33
M125	2LI	<i>Chryseobacterium</i> sp.	≤1,56	-	-	-	-	-	-	-	-
M128	2LI	<i>Acidovorax temperans</i>	3,12	16	8	1	64	20	32	12	9
M130	2LI	<i>Acidovorax</i> sp.	>100	≤2	≤0,25	0,25	2	20	23	30	29
M131	2LI	<i>Acidovorax temperans</i>	100	≤2	≤1	1	≤1	19	33	0	0
M137	2LI	<i>Sphingomonas</i> sp.	>100	≤2	≤0,5	4	≤2	20	22	30	16
M138	2LI	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3,12	-	-	-	-	-	-	-	-
M141	2LI	<i>Pseudomonas</i> sp.	25	≤2	≤1	≤0,25	≤1	24	40	36	27
M142	2LI	<i>Acidovorax</i> sp.	>100	64	≤0,5	4	>128	20	37	22	19

ID	Local	Identificação	Concentração inibitória mínima (CIM mg/L)						Disco difusão - halo de inibição (mm)		
			BGN não-enterobactérias	Cloro	CLO	TET	CIP	CRO	GEN	IMI	CIP
M146	2LI	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	50	4	4	2	128	0	16	0	0
M148	2LI	<i>Shinella</i> sp.	-	>64	4	2	>128	0	16	16	13
M149	2LI	<i>Sphingobium</i> sp.	>100	-	-	-	-	-	-	-	-
M150	2LI	<i>Pseudomonas protegens</i>	>100	8	≤1	≤0,25	64	17	21	25	20
M151	2LI	<i>Azospirillum</i> sp.	≤1,56	-	-	-	-	-	-	-	-
M157	2LI	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	≤2	≤1	≤0,25	≤1	22	50	28	0
M159	2LI	<i>Wautersiella falsenii</i>	25	≤2	2	1	8	10	13	17	18
M163	2LI	<i>Acidovorax</i> sp.	≤1,56	≤2	≤1	≤0,25	8	19	36	32	30
M167	2ST	<i>Acidovorax</i> sp.	≤1,56	≤2	≤1	≤0,25	≤1	16	26	32	20
M174	2ES	<i>Thauera</i> sp.	6,25	-	-	-	-	-	-	-	-
M179	2BT	<i>Sphingomonas</i> sp.	≤1,56	≤2	≤0,5	≤0,12	4	0	37	19	23
M180	2BT	<i>Ralstonia</i> sp.	3,12	4	≤0,5	≤0,12	4	17	40	33	11
M181	2BT	<i>Pseudomonas mendocina</i>	12,5	-	-	-	-	20	33	32	27
M182	2BT	<i>Acidovorax</i> sp.	50	-	-	-	-	9	17	24	18
M183	2BT	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	50	8	≤1	≤0,25	≤1	20	30	27	19
M185	2BT	<i>Acidovorax temperans</i>	100	≤1	≤0,5	≤0,12	≤2	23	40	40	40
M186	2BT	<i>Chryseobacterium</i> sp.	≤1,56	8	1	≤0,12	128	11	20	24	0
M188	2BT	<i>Acidovorax temperans</i>	>100	64	1	≤0,12	16	17	20	19	18
M189	2BT	<i>Acidovorax temperans</i>	100	4	8	4	64	17	17	18	0
M192	2BT	<i>Acidovorax temperans</i>	25	8	8	≤0,25	>64	23	40	26	15
M193	2BT	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	12,5	-	-	-	-	24	34	36	14
M194	2BT	<i>Ralstonia</i> sp.	25	2	≤0,5	≤0,12	128	15	40	30	0
M195	2BT	<i>Acidovorax</i> sp.	>100	4	4	≤0,12	4	18	45	18	0
M196	2BT	<i>Pseudomonas mendocina</i>	>100	-	-	-	-	20	30	30	26
M197	2BT	<i>Pseudomonas mendocina</i>	>100	-	-	-	-	18	30	30	25
M198	2BT	<i>Acidovorax temperans</i>	≤1,56	≤2	≤1	≤0,25	128	18	50	30	31
M199	2BT	<i>Sphingopyxis</i> sp.	25	-	-	-	-	-	-	-	-
M200	2BT	<i>Acidovorax temperans</i>	100	2	≤1	≤0,25	64	19	40	32	30
M201	2BT	<i>Acidovorax</i> sp.	3,12	≤1	≤0,5	≤0,12	≤2	14	37	27	25
M206	2SS	<i>Chryseobacterium gleum</i>	50	8	≤1	≤0,25	>64	11	15	34	15

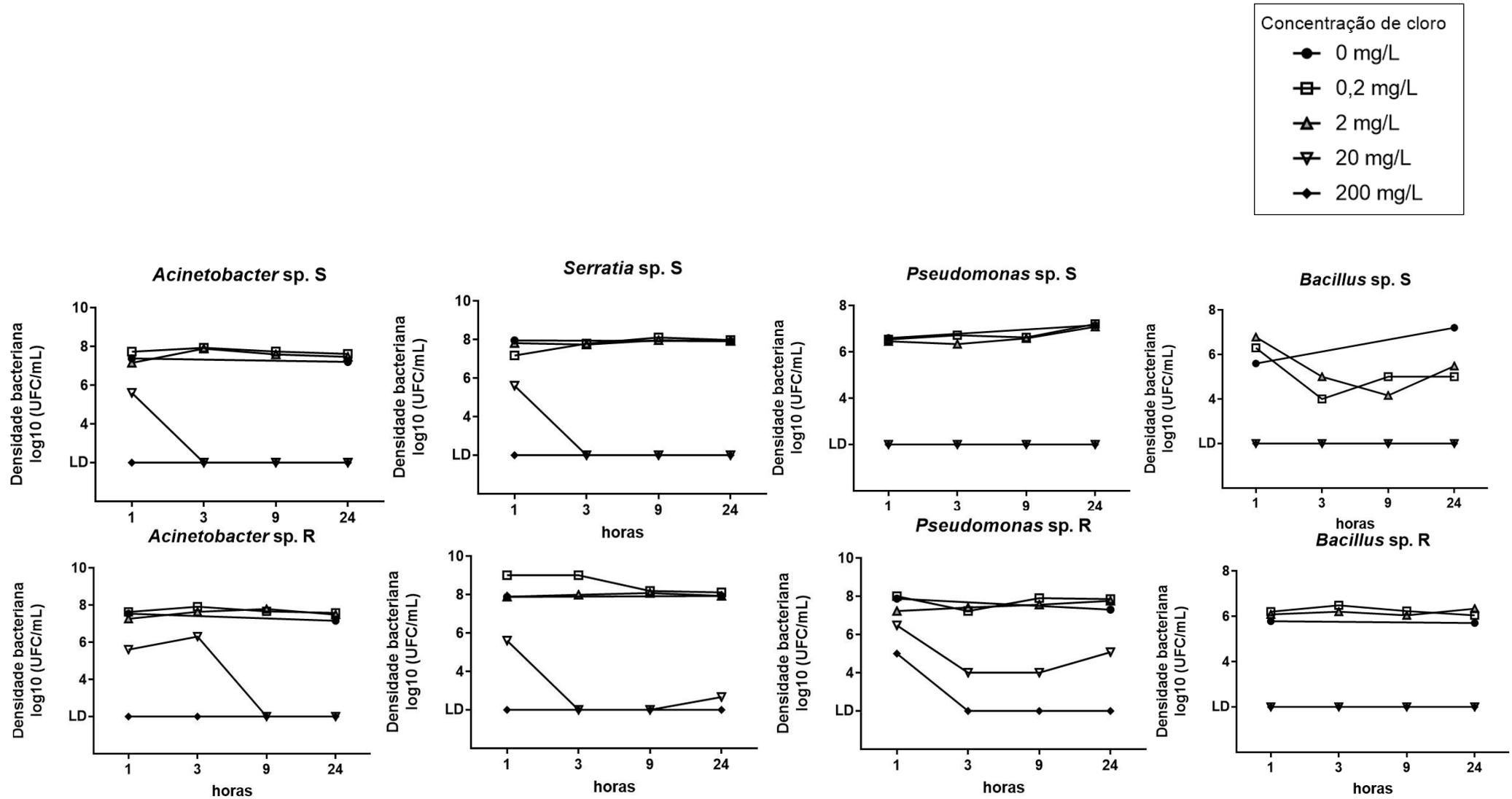
ID	Local	Identificação	Concentração inibitória mínima (CIM mg/L)					Disco difusão - halo de inibição (mm)				
			BGN não-enterobactérias	Cloro	CLO	TET	CIP	CRO	GEN	IMI	CIP	CAZ
M207	2SS	<i>Shinella</i> sp.	>100	>64	8	>8	32	10	22	0	0	
M210	2SS	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	≤1,56	≤2	≤1	≤0,25	≤1	21	35	35	25	
M211	2SS	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	6,25	≤2	≤1	≤0,25	≤1	0	0	25	13	
M212	2SS	<i>Delftia acidovorans</i>	3,12	4	≤1	≤0,25	>64	0	27	24	25	
M213	2SS	<i>Elizabethkingia miricola</i>	3,12	8	8	≤0,25	8	0	0	27	0	
M214	2SS	<i>Chromobacterium</i> sp.	25	-	-	-	-	-	-	-	-	
M218	2SS	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	100	4	2	≤0,25	>64	0	0	24	0	
M219	2SS	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	50				9	0	25	15		
M220	2SS	<i>Chryseobacterium</i> sp.	3,12	32	16	>8	32	11	0	25	0	
M232	2LI	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	≤1,56	≤2	≤1	≤0,25	64	23	30	10	0	
M237	2LI	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3,12	2	>64	4	16	19	29	25	28	
M241	2LI	<i>Chryseobacterium</i> sp.	3,12	4	1	0,5	16	18	38	29	19	
Bacilos Gram Positivos			Cloro				GEN	TET	CIP	ERI	CRO	CLO
M3	1BT	<i>Bacillus subtilis</i>	3,12				25	20	33	36	29	-
M4	1BT	<i>Bacillus vallismortis</i>	6,25				25	19	32	32	28	-
M10	1SS	<i>Leucobacter</i> sp.	>100				20	13	9	23	24	16
M18	1ST	<i>Bacillus cereus</i>					19	24	34	14	25	-
M22	1ST	<i>Bacillus</i> sp.					19	10	27	12	26	20
M27	1ST	<i>Bacillus cereus</i>	>100				24	18	28	20	14	-
M33	1SS	<i>Bacillus</i> sp.	100				24	24	30	15	17	-
M35	1SS	<i>Bacillus pumilus</i>	6,25				19	27	29	29	26	-
M49	1SS	<i>Bacillus cereus</i>	6,25				-	23	30	24	19	-
M50	1SS	<i>Leucobacter</i> sp.	12,5				20	21	11	24	26	16
M56	1SS	<i>Bacillus</i> sp.	12,5				24	14	27	22	9	-
M57	1SS	<i>Leucobacter</i> sp.	≤1,56				20	13	13	25	23	15
M64	1ST	<i>Bacillus cereus</i>	50				22	22	23	0	0	-
M66	1LI	<i>Deinococcus</i> sp.	≤1,56				28	30	20	25	40	40
M77	1LI	<i>Bacillus</i> sp.	12,5				22	20	31	30	-	-

ID	Local	Identificação	Concentração inibitória mínima (CIM mg/L)	Disco difusão - halo de inibição (mm)
		Outros	Cloro	
M156	2LI	sem identificação	100	
M158	2LI	sem identificação	50	
M203	1SS	sem identificação	3,12	
M228	2ST	sem identificação	≤1,56	
M231	1ST	sem identificação	12,5	

Anexo G– Valores médios de CIM e Desvio Padrão para diferentes espécies bacterianas sem valores de referência



Anexo H – Imagens: viabilidade dos isolados testados durante exposição a diferentes concentrações de cloro, em diferentes tempos. LD: limite de detecção da técnica (≤ 100 UFC/mL)



Anexo I – Resultados de Análise de Variância e agrupamento por teste Scott-Knott dos pontos amostrados, no teste de suscetibilidade ao cloro por microdiluição.

Variável analisada: CIM CLORO

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PONTO	4	40602.012093	10150.503023	5.904	0.0002
EPOCA	1	4674.282145	4674.282145	2.719	0.1008
PONTO*EPOCA	4	2932.275258	733.068814	0.426	0.7894
erro	186	319757.746329	1719.127668		

Total corrigido 195 367966.315824

CV (%) = 111.14

Média geral: 37.3075510 Número de observações: 196

Teste Scott-Knott (1974) para a FV PONTO

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 34,3340319730407

Erro padrão: 7,07606252013138

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
-------------	--------	---------------------

ST	20.966667	a1
----	-----------	----

ES	21.987727	a1
----	-----------	----

SS	28.868776	a1
----	-----------	----

BT	40.670333	a2
----	-----------	----

LI	56.483387	a2
----	-----------	----

Teste Scott-Knott (1974) para a FV EPOCA

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 97,7448979591837

Erro padrão: 4,19379324921456

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
-------------	--------	---------------------

1	32.667184	a1
---	-----------	----

2	42.446882	a1
---	-----------	----

Análise do desdobramento de PONTO dentro de cada nível de:EPOCA

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PONTO /1	4	26561.812879	6640.453220	3.863	0.0049
PONTO /2	4	16972.474471	4243.118618	2.468	0.0463
Erro	186	319757.746329	1719.127668		

Anexo J – Correlação de Pearson para CIMs de Cloro e antimicrobianos

Amostra 1	Amostra 2	N	Correlação	IC de 95% para p	Valor-p
CIP	Cloro	125	-0,088	(-0,260; 0,089)	0,329
CRO	Cloro	123	-0,024	(-0,201; 0,153)	0,789
AMP	Cloro	97	0,133	(-0,068; 0,324)	0,194
CRO	CIP	126	-0,033	(-0,206; 0,143)	0,717
AMP	CIP	100	-0,023	(-0,218; 0,174)	0,822
AMP	CRO	100	-0,071	(-0,264; 0,127)	0,480