

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**CAMPUS LONDRINA**  
**CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

**GABRIELA BATISTA GOMES**

**MULTIRRESISTÊNCIA DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DO LAGO  
IGAPÓ NA CIDADE DE LONDRINA - PR**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**LONDRINA**  
**2015**

**GABRIELA BATISTA GOMES**

**MULTIRRESISTÊNCIA DE *Enterococcus* sp ISOLADOS DO LAGO  
IGAPÓ NA CIDADE DE LONDRINA - PR**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação  
apresentado como requisito à obtenção do grau de  
Bacharel em Engenharia Ambiental da  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Câmpus Londrina.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Furlaneto Maia

**LONDRINA**

**2015**



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Londrina  
Coordenação de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Monografia

**MULTIRRESISTÊNCIA DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DO LAGO  
IGAPÓ NA CIDADE DE LONDRINA - PR**

por

GABRIELA BATISTA GOMES

Monografia apresentada no dia 30 de Junho de 2015 ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho \_\_\_\_\_ (aprovado, aprovado com restrições ou reprovado).

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Vanesca Priscila Camargo Rocha  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana Feijó de Souza Daniel  
(UTFPR)

\_\_\_\_\_  
Profa. Dr<sup>a</sup>. Luciana Furlaneto Maia  
(UTFPR)  
Orientador

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ligia Flávia Antunes Batista  
Responsável pelo TCC do Curso de Eng. Ambiental

Obs: A folha de aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus, à minha mãe Zandira Batista por me proporcionar toda a estrutura de realizar o sonho de cursar Engenharia Ambiental, pelo incentivo e pelo carinho. Aos meus irmãos Julia B. Gomes, Leonardo B. Gomes, ao meu noivo Antonio Bravo e aos demais familiares pelo incentivo e apoio.

À minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Luciana Furlaneto Maia pelo apoio, pela orientação, por ter proporcionado toda a estrutura para realizar esse trabalho.

As minha amigas Jaqueline R. Imbriani, Jaqueline S. Silva e Liliana Puzzy pela amizade, pelo apoio e força, pelo companheirismo, pelos conselhos e por todo o carinho.

À minha amiga de laboratório Sharise Beatriz pelo apoio e pelas orientações.

E a todos que direta e indiretamente me ajudaram a realizar esse trabalho, muito obrigada a todos vocês.

## RESUMO

GOMES, Gabriela B. Multirresistência de *Enterococcus* sp isolados do Lago Igapó na cidade de Londrina – PR. 2015. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

A análise de indicadores bacterianos em corpos hídricos é um método bastante eficaz e sensível para detecção de poluição. As bactérias do gênero *Enterococcus* são consideradas como indicadores de contaminação fecal, pois fazem parte do organismo humano e da flora intestinal de alguns animais de sangue quente. O presente estudo teve como objetivo isolar e verificar a multirresistência de *Enterococcus* sp provenientes dos Lagos Igapó 1, 2 e 3, na cidade de Londrina-PR. Os pontos de coleta foram uma área utilizada para lazer e outra área mais afastada que não é utilizada para lazer. Para o isolamento de *Enterococcus* sp. foi utilizada a técnica de membrana filtrante, onde as membranas foram transferidas para placas de Petri contendo ágar canamicina esculina azida e incubadas à 37° C por 24 horas. Foram selecionadas aleatoriamente 30 colônias de *Enterococcus* e para a confirmação do gênero e da espécie foram realizadas análises fenotípicas (coloração de Gram, catalase, crescimento em NaCl 6,5%, pH 9.6, e temperaturas de 10° e 45°C) e genotípicas empregando a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase. Para observarmos a suscetibilidade a antimicrobianos foi empregada a técnica de disco-difusão conforme estabelecido pelo CLSI. Como resultados obtivemos que 100% dos isolados pertenciam ao gênero *Enterococcus*. Dos 30 isolados 47% foram identificados como *E. faecium*, 26,7% *E. gallinarum*, 6,7% *E. casseliflavus/E. flavences* e 13,33% *Enterococcus spp.*. Quanto a suscetibilidade a antimicrobianos 100% das espécies foram sensíveis a Gentamicina, Norfloxacin, Cloranfenicol, Estreptomicina e Ciprofloxacina. Já os resultados de resistência obtivemos que: 96,7% dos isolados foram resistentes a Vancomicina, Penicilina; 10% a Tetraciclina e 20% a Amipicilina. Para observarmos a suscetibilidade a metais pesados foi empregada a técnica de concentrações inibidoras de metais em placa gradiente. Como resultado obtivemos que 100% das amostras foram resistentes ao cobre e chumbo e 88% foram resistentes ao zinco. Diversos isolados apresentaram resistência a mais de dois antimicrobianos testados, caracterizando assim a multirresistência. Diante dos resultados apresentados nesse estudo, podemos concluir que há *Enterococcus* sp na água do Lago Igapó que é utilizado pelo cidadãos como um lago de lazer e que estes apresentam resistência a metais pesados e a uma ampla gama de antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento de infecções enterocócicas dificultando a terapêutica e prejudicando não só a saúde das pessoas que utilizam o lago, mas também a vida aquática presente nesse ambiente.

**Palavras-chave:** *Enterococcus* sp. Lago Igapó. Indicadores microbiológicos.

## ABSTRACT

GOMES, Gabriela B. Multiresistant *Enterococcus* sp isolated from Lake Igapó in the city of Londrina - PR.2015. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

The analysis of bacterial indicators in water is a very effective and sensitive method for pollution detection. Bacteria of the genus *Enterococcus* are regarded as indicators of fecal contamination, as part of the human body and the intestinal flora of some warm-blooded animals. This study aimed to isolate and verify the multidrug resistance of *Enterococcus* sp from the Lagos Igapó I, II and III in the city of Londrina-PR. The collection points were an area used for recreation and other more remote area that is not used for recreation. For the isolation of *Enterococcus* sp. It was used the membrane filter technique, where the membranes were transferred to Petri dishes containing esculin agar azide kanamycin and incubated at 37 ° C for 24 hours. They randomly selected 30 colonies of *Enterococcus* and to confirm the genus and species were held phenotypic analysis (Gram Positive, catalase, growth in 6.5% NaCl, pH 9.6, and temperatures of 10 and 45°C) and genotypic employing the technique Polymerase Chain Reaction. To observe the susceptibility to antimicrobial agents was employed to disk diffusion technique as established by the CLSI. As a result we obtained that 100% of the isolates belonged to the genus *Enterococcus*. Of the 30 isolates 47% were identified as *E. faecium*, *E. gallinarum* 26.7%, 6.7% *E. casseliflavus* / *E. flavences* and *Enterococcus* spp. 13.33%. The susceptibility to antimicrobial 100% of the species were sensitive to Gentamicin, Norfloxacin, Chloramphenicol, Streptomycin and Ciprofloxacin. Already strength results obtained that: 96.7% of the isolates were resistant to vancomycin, penicillin; 10% tetracycline and 20% Amipicilina. To observe the susceptibility to heavy metals was used the technique of inhibitory concentrations of metals in gradient plate. As a result we obtained 100% of the strains were resistant to copper and chubo and 88% were resistant to zinc. Several isolates tested were resistant to more than two antibiotics, characterizing multidrug resistance. From the results presented in this study we can conclude that there *Enterococcus* sp in Igapó Lake that is used by the public as a recreational pond and that these show resistance to heavy metals and a wide range of antimicrobial routinely used in the treatment of enterococcal infections complicating therapy and harming not only the health of people who use the lake but also the aquatic life present in that environment.

**Keywords:** *Enterococcus* sp. Igapó Lake. Microbiological Indicators.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Localização dos Lago Igapó 1, 2, 3, na cidade de Londrina – PR .....	21
<b>Figura 2:</b> Pontos de Coleta do Lago Igapó I. (A) Ponto em área de recreação. (B) Ponto em área afastada (seta).....	22
<b>Figura 3:</b> Pontos de coleta do Lago Igapó 2.....	23
<b>Figura 4:</b> Pontos de coleta do Lago Igapó III.....	24
<b>Figura 5:</b> Fluxograma de Metodologias.....	25
<b>Figura 6:</b> Sistema de filtração com adaptação ao kitossato e bomba de vácuo.....	27
<b>Figura 7:</b> Esquematização da técnica de suscetibilidade de metais pesados em placa gradiente. ....	33
<b>Figura 8:</b> Coloração característica de <i>Enterococcus</i> em ágar KEA. Seta indica as colônias negras identificadas como <i>Enterococcus</i> . ....	35
<b>Figura 9:</b> Características morfotintoriais de <i>Enterococcus</i> sp (seta).....	37
<b>Figura 10:</b> Gel representativo para confirmação do gênero. Amplificação na região de peso molecular de 112 pb (seta). L: marcador de peso molecular 100 pb; C+: controle positivo e C-: controle negativo. ....	37
<b>Figura 11:</b> Frequência de espécies pertencentes ao gênero <i>Enterococcus</i> . ....	38
<b>Figura 12:</b> Suscetibilidade de <i>Enterococcus</i> a antimicrobianos de uso clínico. ....	39
<b>Figura 13:</b> Crescimento de <i>Enterococcus</i> na Placa Gradiente contendo metal pesado.....	40
<b>Figura 14:</b> Suscetibilidade a metais pesado.....	41

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>4. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
4.1 HISTÓRICO DO LAGO IGAPÓ .....	11
4.2 POLUIÇÃO E CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS .....	12
4.3 INDICADORES DE QUALIDADE DA ÁGUA .....	15
4.4 <i>ENTEROCOCCUS SP</i> .....	16
4.5 RESISTÊNCIAS A ANTIMICROBIANOS .....	18
4.6 RESITÊNCIA A METAIS PESADO .....	19
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	21
5.2 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA .....	24
5.3 COLETA DA ÁGUA .....	26
5.4 TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE .....	26
5.5 ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO .....	27
5.6 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA .....	28
5.6.1 Produção de enzima catalase .....	28
5.6.2 Características morfotintoriais .....	28
5.6.3 Crescimento em presença de 6,5% de NaCl .....	29
5.6.4 Crescimento em pH 9.6 .....	29
5.6.5 Crescimento em temperatura de 10°C e 45°C .....	29
5.7 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA .....	30
5.8 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA .....	31
5.9 SUSTETIBILIDADE A METAIS PESADOS .....	32
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A água é o elemento essencial à vida para todos os organismos, sendo a sua disponibilidade um dos fatores mais importantes a moldar os ecossistemas. A água disponível é muito superior ao total consumido pela população, mas a distribuição dela é extremamente desigual. Vários fatores acarretam em problemas hídricos, seja por sua escassez ou pela qualidade inadequada, alguns desses fatores são: a má distribuição e a poluição por ações antrópicas tornando parte da água imprópria para diversos usos (MOTA, 2006).

A utilização dos corpos hídricos pode ser encontrada de diversas maneiras, atendendo a várias necessidades simultaneamente. Alguns exemplos desses diversos usos da água são abastecimento, irrigação, lazer e etc. O mau uso ou o uso inconsciente dos recursos hídricos trazem consequência como a sua poluição. Von Sperling (1996) caracteriza como poluição a adição de substâncias que direta ou indiretamente alteram a natureza do corpo d'água de uma maneira que prejudique os legítimos usos à que deles são feitos.

Uma maneira de caracterizar os recursos hídricos pode estar relacionada com a sua qualidade, na qual depende diretamente da quantidade de água existente para dissolver, diluir e transportar as substâncias benéficas e maléficas para os seres que compõem as cadeias alimentares. Uma dessas substâncias maléficas é a presença em grande quantidade de microrganismos patogênicos, como por exemplo, bactérias do grupo coliformes (BRAGA, 2005).

A análise de indicadores biológicos nos corpos hídricos é um método bastante eficaz e sensível para a detecção de substâncias. Os indicadores de contaminação fecal estão em grande quantidade nos dejetos de animais homeotérmicos e apresentam persistência em ambiente aquático. As bactérias do grupo coliforme são utilizadas à vários anos como bons indicadores de contaminação, pois atendem aos requisitos como presença em grande quantidade nas fezes humanas, persistência e resistência no meio aquático. A presença desses microrganismos considera-se que a água estará contaminada, pois eles apresentam riscos à saúde (HERINGER et al, 2007; CETESB, 2008).

Enterococos são bactérias encontradas no intestino de animais de sangue quente, incluindo os seres humanos. São patógenos oportunistas que causam milhares de infecções, no qual trazem grandes riscos a saúde humana. Tem uma grande facilidade para serem cultivados, pois apresentam maior resistência e sobrevivem a um tempo maior se comparado com *E. coli* e outros coliformes termotolerantes. Crescem em temperaturas entre 10 e 45°C, toleram pH 9,6 e ambientes com 6,5% de NaCl (AHMED et al, 2012, BYAPPANAHALLI et al, 2012. MURRAY et al, 2011).

Os atributos de maior significância em enterococos é a expressão de resistência a vários antimicrobianos comumente utilizados e a aquisição de genes de resistência. O tratamento de infecções enterocócicas é complicado, pois a maioria dos antimicrobianos não apresenta ação bactericida nas concentrações clinicamente relevantes. A restrição cuidadosa com o uso de antimicrobianos e a implementação de práticas apropriadas no controle de infecções podem reduzir o risco de colonização desse microrganismo (MURRAY et al, 2011).

Bactérias que possuem o gene de resistência a antibióticos são constituídas por elementos genéticos móveis, que são facilmente trocados entre outras bactérias. Muitos desses elementos genéticos móveis codificam resistência a múltiplos antibióticos, metais pesados e outros compostos tóxicos (BRANCO et al, 2005).

A utilização de métodos de análise microbiológica molecular que apresentam resultados em prazos curtos vem sendo utilizada cada vez mais. Essa tecnologia é chamada de reação em cadeia da polimerase (PCR), foi desenvolvida para detecção específica de diferentes organismos indicadores fecais e também agentes patogênicos em apenas algumas horas (HAUGLAND et al, 2012).

Portanto, esse trabalho teve como objetivo isolar e verificar a multiresistência de *Enterococcus sp* provenientes dos Lagos Igapó I, II e III, encontrados na cidade de Londrina – PR. O lago é caracterizado com uma das mais belas áreas de lazer da cidade, utilizados para esportes, pesca, banho e etc.. Os pontos de coleta foram em uma área utilizada para lazer e outra área mais afastada que não é utilizada para lazer, para com isso verificar a possível contaminação desse corpo hídrico e quais os impactos causados aos cidadãos que utilizam esse lago como uma área de lazer.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a resistência de *Enterococcus sp* à metais pesados e antibióticos provenientes dos Lagos Igapó I, II e III, da cidade de Londrina – PR.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar bactérias do gênero *Enterococcus sp* de corpos d'água urbano;
- Analisar a resistência de bactérias *Enterococcus* a antibióticos;
- Analisar a resistência à metais pesados dos isolados, cobre, chumbo e zinco das bactérias *Enterococcus*.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 HISTÓRICO DO LAGO IGAPÓ

O Lago foi inaugurado na cidade de Londrina, em 10 de Dezembro de 1959, obra realizada pelo prefeito Antônio Fernandes Sobrinho. Foi implantado em uma área distante da malha urbana, no qual resultou em um abandono, descuido e com pouco uso público efetivo pela população. Além do que, em suas proximidades havia a presença de curtumes, passagens de caminhões pesado e também a contaminação da agricultura ao redor. Em 1970 iniciou o projeto de urbanização do lago, a prefeitura passou a dotar a área com inúmeras infra-estrutura que buscavam, por meio da prática do lazer, utilizar a sua área. Esse projeto também visou à melhora da saúde da população e a qualidade de vida por meio do lazer, tendo como principal foco a eliminação da contaminação e da poluição que se encontrava ao redor do lago (BORTOLO, 2010).

Os problemas de poluição e contaminação do lago existem desde a década de 70 até os dias atuais. Em 1990, foi realizada a revitalização do Lago Igapó I, foi feito um mutirão envolvendo entidades públicas, voluntários e pescadores, para a retirada dos entulhos e detritos existentes no lago. Já em 1996, devido ao aumento de poluentes no lago, forem realizadas ações para localizar as fontes de poluição. Além disso, o lago foi esvaziado, desassoreado, limpo e sua margem foi novamente revitalizada. Em seguida, no início de 2000, começou a construção de novos empreendimentos no entorno do lago Igapó II, proporcionando então um processo de verticalização nas proximidades do lago. Esse fato acarretou o esvaziamento do Lago II para a retirada da lama tóxica e também o desassoreamento devido as obras em sua proximidade (LORENZO, 2011).

Em 2013, em entrevista para o Jornal G1 Globo, a pesquisadora Josefa Santos Yabe, afirmou que em suas pesquisas, constatou-se a contaminação do lago com metais pesados chumbo e cádmio e também contaminação com tintas utilizada para pinturas de embarcações. Pelegrino (2013) em notícia pelo Jornal de Londrina, afirmou

que em estudos realizados pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) mostram que o Lago Igapó IV apresentou níveis de contaminação muito superiores aos dos lagos I e II. Nessa pesquisa constatou um número de bactérias do grupo coliformes fecais excedentes ao limite estabelecido pela legislação, o que indica uma grande contaminação microbiológica. A presença dessas bactérias indicam o lançamento de esgoto sanitário no lago.

Desde 1970 até atualmente o Lago Igapó, que é considerado como um cartão postal para a cidade de Londrina e utilizado para práticas de esporte, lazer e também uma bela visão paisagística da cidade vem sofrendo vários impactos ambientais como, por exemplo, assoreamento devido à construção civil, efluentes clandestinos e também o descarte inadequado de lixos dentro do lago. Fato estes que prejudicam o meio ambiente, os organismos que vivem nesse habitat e o bem estar da população do município.

#### 4.2 POLUIÇÃO E CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS

A água é uma das substâncias mais comuns existentes na natureza, é encontrada principalmente no estado líquido, constituindo de um recurso natural renovável por meio do ciclo hidrológico. Todos os organismos vivos dependem de água para sobreviver, por isso é fundamental que os recursos hídricos apresentem características físicas e químicas adequadas para a sua utilização. A água deve conter substâncias essenciais à vida e estar livre de outras que possam produzir efeitos deletérios aos organismos que compõem a cadeia alimentar. Assim, podemos afirmar que a disponibilidade da água está relacionada não somente com a sua quantidade disponível, mas sim com a qualidade adequada, sendo satisfatória para suprir as necessidades de uma biota (BRAGA, 2005).

A qualidade da água e a poluição da água são relacionadas diretamente com os usos da água. Os principais usos da água são: abastecimento doméstico, abastecimento industrial, irrigação, dessedentação de animais, preservação da flora e

da fauna, recreação e lazer, criação de espécies, geração de energia elétrica, navegação, harmonia paisagística, diluição e transporte de despejos. Destes usos os quatro primeiros implicam na retirada da água dos corpos hídricos. Dependendo do uso pode ocasionar em parâmetros mais exigentes de qualidade, como no caso de abastecimento doméstico e industrial. (VON SPERLING, 2005).

A poluição ocorre pelo mau uso da água, de acordo com a Lei nº 6.938 de 31 de agosto de 1981, a poluição é a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente prejudiquem a saúde, a segurança e o bem estar da população, criem condições adversas às atividades sociais e econômicas, afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente e lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos. E essa mesma lei também define degradação da qualidade ambiental como a alteração adversa das características do meio ambiente.

Braga (2005) também definiu que poluição da água é qualquer alteração de suas características, tanto química, física ou biológica, causada por ações provocadas pelo homem ou também por ações naturais. O mesmo autor define contaminação como transmissão de substâncias ou microrganismos nocivos à saúde pela água. Então podemos dizer que a presença de organismos patogênicos pode ser classificada como um tipo de contaminação.

Os poluentes podem ser introduzidos no meio aquático de forma pontual e difusa. A forma pontual ocorre quando o lançamento da carga poluidora é feito de maneira concentrada em determinado local, são facilmente identificadas, e, portanto o controle é mais rápido. Já a forma difusa os poluentes alcançam o manancial de modo disperso, não tem um ponto de lançamento específico e podem ocorrer ao longo da margem dos rios. A classificação dos poluentes ocorre de acordo com a natureza e com os principais impactos causados pelo seu lançamento ao meio ambiente. Podem alcançar as águas superficiais e subterrâneas através do lançamento direto, pela precipitação, pelo escoamento superficial do solo ou por infiltração. As principais fontes de poluição de águas superficiais são: esgotos domésticos e industriais, águas pluviais carregando impurezas da superfície do solo, pesticidas, fertilizantes, detergentes,

precipitação de poluentes atmosféricos, alteração nas margens dos mananciais, provocando o carreamento de solo, como consequência da erosão (MOTA, 2006).

Braga (2005) também considera os metais como uma fonte de poluição. Todos os metais são solúveis em água, podem gerar danos à saúde em função da quantidade ingerida, pela sua toxicidade, potenciais carcinogênicos, mutagênicos ou teratogênicos. Em geral, os metais tóxicos estão presentes em quantidades diminutas no meio aquático por ação de fenômenos naturais, mas podem ser despejados em quantidades maiores e significativas por atividades industriais, agrícolas e de mineração. Um organismo aquático pode apresentar dois tipos de comportamento em relação aos metais: ser sensível à ação tóxica ou ser resistente, mas o fato é que os organismos podem bioacumular, potencializando o seu efeito nocivo ao longo da cadeia alimentar.

As consequências dessas fontes de poluição podem ser de caráter sanitário, ecológico, social ou econômico. Como por exemplo, prejuízos ao abastecimento humano, transmissão de doenças; prejuízos a outros usos da água tais como, industrial, pesca, recreação; agravamento dos problemas de escassez de água de boa qualidade; elevação do custo de tratamento da água, refletindo-se no preço a ser pago pela população; assoreamento dos mananciais, resultando em problemas de diminuição da oferta de água e de inundações; desvalorização das propriedades marginais; prejuízos aos peixes e a outros organismos aquáticos; desequilíbrio ecológico; proliferação excessiva de algas e de vegetação aquática, como suas consequências negativas; degradação da paisagem; e impactos sobre a qualidade de vida da população (MOTA, 2006)

O lançamento de efluente de esgoto em corpos hídricos, sem o padrão de qualidade determinado pela legislação, pode ser considerado uma das principais causas de poluição das águas, principalmente por microrganismos. Normalmente, encontra-se um excesso de carga orgânica nesses efluentes, então se a quantidade de matéria orgânica é grande e a poluição das águas é alta, uma série de processos será alterada havendo muito alimento à disposição como proteínas, aminoácidos, carboidratos, gorduras e conseqüente proliferação dos microrganismos presentes, tais como, as bactérias *Enterococcus* (HERINGER et al. 2007)

De acordo com Mota (2006), a contaminação das águas por microrganismos patogênicos ocorre pela disposição de dejetos nos corpos d'água resultando assim, em um grave problema sanitário. Um corpo d'água que recebeu esgotos domésticos pode constituir-se em um veículo de transmissão de várias doenças, por isso é essencial a utilização de indicadores microbiológico, principalmente do grupo coliformes fecais para a determinação da qualidade da água. O exame bacteriológico da água é muito importante quando a mesma se destina ao consumo humano, irrigação, contato primário, entre outros, como é o caso do Lago Igapó na cidade de Londrina.

#### 4.3 INDICADORES DE QUALIDADE DA ÁGUA

A qualidade da água pode ser definida por diversos parâmetros que mostram as suas principais características físicas, químicas e biológicas, que representam impurezas quando ultrapassam determinados valores estabelecidos por legislações. Esses parâmetros são importantes para os usos e funções que o corpo hídrico poderá receber. Nesse estudo, daremos ênfase nos parâmetros biológicos (DUARTE, 2011).

Os parâmetros biológicos podem ser representados por microrganismos (bactérias, fungos, vírus, algas, e etc.) que desempenham diversas funções de grande importância, principalmente relacionadas com a transformação da matéria dentro dos ciclos bioenergéticos. Em termos de qualidade biológica da água, os organismos patogênicos são de grande relevância, devido à possibilidade e transmissão de doenças. A transmissão de doenças pela água pode ser efetuada de forma indireta, através de organismos indicadores de contaminação fecal, pertencentes ao grupo de coliformes. Se houver a detecção em índices elevados de bactérias, associa-se a níveis elevados de patógenos para humanos, pois a maioria dos organismos patogênicos podem ser causadores de doenças, no qual predomina doenças de origem fecal (VON SPERLING, 2005; AMARAL, 2007).

Os microrganismos tradicionalmente usados para monitorar a qualidade das águas recreativas ou potáveis, consistem em um grupo de bactérias patogênicas

encontradas no trato gastrointestinal dos animais de sangue quente, as mais comuns são as bactérias *Escherichia coli*. Atualmente outras bactérias, como *Enterococcus* têm sido isoladas de águas recreacionais e a presença destes microrganismos sugere riscos à saúde por meio do contato corporal, ingestão ou inalação e têm sido propostos como indicadores de qualidade complementares aos coliformes (DUARTE, 2011).

Utilizam-se microrganismos como indicadores de qualidade devido a sua sensibilidade ou até mesmo tolerância de vários parâmetros de poluição. Os organismos integram as condições ambientais durante toda a sua vida, permitindo que a avaliação biológica seja utilizada com bastante eficiência na detecção tanto de ondas tóxicas intermitentes agudas quanto de lançamentos crônicos contínuos. A habilidade de proteger os ecossistemas depende da capacidade de distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais, utilizando indicadores que melhor traduzem a contaminação dos corpos hídricos. Portanto é de extrema importância a avaliação da qualidade da água do ponto de vista microbiológico, para garantir a qualidade da saúde do ser humano e do meio ambiente (BUSS, et al. 2003).

#### 4.4 *Enterococcus* sp

Os enterococos são cocos Gram positivos e catalase negativo, tipicamente dispostos aos pares em cadeias curtas. Suas características são tolerâncias adversas de crescimento. Crescem tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, e também em uma ampla faixa de temperatura, de 10°C a 45°C. São halotolerantes, no qual, tem a capacidade de sobreviverem à presença de 6,5% de cloreto de sódio e sobrevivem em pH 9.6. Devido a sua resistência ambiental, sua presença evidencia inadequação das práticas sanitárias e mostram uma contaminação que pode não ser necessariamente recente (MURRAY, et al, 2011)

São consideradas como bactérias comensais e benignas no meio gastrointestinal do ser humano e dos animais, mas se ocorrem fora do seu habitat normal, são causadoras de doenças patógenas, como infecções do trato urinário,

feridas e doenças como bacteremia, endocardites subagudas e meningites (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Byappanahalli et al (2012) afirma que essas bactérias estão amplamente distribuídas no ambiente em uma variedade de habitats, mesmo quando há pouca, ou até mesmo nenhuma entrada de seres humanos ou de fezes de animais. Estes ambientes incluem o solo, sedimentos, areia da praia, vegetação aquática e terrestre e corpos hídricos (rios, córregos, riachos, águas salinas). Bactérias indicadoras de contaminação fecal podem potencialmente impactar a qualidade da água, do solo, ou de qualquer outro ambiente em que elas se encontram, e assim, existe uma necessidade de uma melhor compreensão do seu destino nestes ecossistemas.

Uma grande preocupação com as bactérias *Enterococcus sp* é a sua alta resistência a antimicrobianos. Possuem genes de resistência a vários antibióticos como gentamicina, estreptomicina, penicilina, ampicilina, vancomicina e teicoplanina, o que preocupa o setor de controle de infecção hospitalar e a comunidade médica, pois dificulta a terapêutica. Essa resistência pode ser transferida de maneira direta ou indireta aos seres humanos. A maneira direta ocorre quando as bactérias resistentes infectam seres humanos, e a maneira indireta ocorre quando as bactérias presentes no trato intestinal dos animais transferem seus genes de resistência à população bacteriana que podem sobreviver em locais como águas de rios, lagoas, e solo. Por isso se dá a importância da identificação da contaminação fecal em ambientes que possam estar contaminados por essa espécie (HENKES, 2010).

É relatado aproximadamente 38 espécies de *Enterococcus* reconhecidas como importantes patógenos humanos, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as espécies mais frequentes e que apresentam maior importância clínica e responsáveis por uma grande quantidade de infecções humanas. As espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* também são importantes, pois apresentam resistência intrínseca ao antibiótico vancomicina (MURRAY, et al, 2011).

Byappanahalli, et al (2012) em seus estudos demonstram que *Enterococcus* como indicadores de contaminação fecal podem ser mais apropriadas do que *E. coli* devido a sua correlação entre concentrações elevadas de *Enterococcus* e o risco de contrair doenças graves durante o uso recreacional da água. Por isso, levaram a

utilização generalizada dessas bactérias como ferramenta para avaliar a qualidade da água em todo o mundo.

#### 4.5 RESISTÊNCIAS A ANTIMICROBIANOS

Devido à ampla distribuição ambiental dos enterococos, estas bactérias podem funcionar como vetores para a propagação de determinantes de resistência microbiana, que através da cadeia alimentar pode ser transferida para os seres humanos. A resistência destas bactérias a alguns antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de infecções ocorre pelo fato da necessidade do microrganismo de sobreviver e persistir em ambientes altamente competitivos, como o trato gastrointestinal (SHMIDT, 2009).

A crescente importância dos enterococos como patógenos pode ser atribuída pela sua capacidade natural de adquirir material genético através de mutações, ou seja, elementos que codificam características genéticas, que permitem a sobrevivência destes microrganismos em ambientes estressantes, isto é, a variabilidade genética e a multiplicação acelerada permitem que as bactérias desenvolvam mutações específicas para adaptarem-se a ambientes diversos. Os enterococos demonstram uma variedade de mecanismos para se tornarem resistentes a muitas classes de antimicrobianos. Devido a estas características começaram a surgir um grande número de linhagens de enterococos multirresistentes (SHMIDT, 2009; BERNER, 2008).

Em isolados de *Enterococcus* sp. são encontrados um número cada vez maior de resistência aos agentes antimicrobianos, destacando-se a penicilina, ampicilina e vancomicina. Assim, as alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções com enterococos multirresistente e resistentes a antibiótico estão cada vez mais restrita, por isso o uso excessivo de antimicrobianos pode ser um grande problema para a sociedade, pois bactérias adquirem a resistência e irá transferir para os outros seres vivos (RUZON, 2009).

A contaminação microbiana de corpos d'água por lançamento de esgotos clandestinos e a contaminação fecal transmitida por animais são conhecidos por um grande problema para a resistência antimicrobiana. Águas residuais e resíduos de animais são reservatórios de genes de resistência antibiótica e bactérias patogênicas multirresistentes aos antibióticos (MAR – definida como a resistência de pelo menos dois antimicrobianos), que representam uma ameaça à saúde humana. A resistência adquirida para um número de antibióticos, incluindo a vancomicina e aminoglicosídeos apresenta um problema no tratamento de infecções por enterococos, bem como uma ameaça de resistência que poderá se espalhar para o ambiente através da transferência de genes de resistência e alguns fatores de virulência de enterococos a bactérias patogênicas (FURTULA et al, 2013).

#### 4.6 RESISTÊNCIA A METAIS PESADO

Vários metais são considerados essenciais para o crescimento de organismos procarióticos e eucarióticos, desde que em baixas concentrações. Mas metais como chumbo, zinco, cádmio são considerados extremamente tóxicos, mesmo em concentrações mínimas. Os metais encontram-se distribuídos na natureza em pequenas concentrações, entretanto, com a intervenção do homem, essas concentrações excederam os seus limites toleráveis, podendo causar a contaminação com resíduos desses metais, visto que tanto animais quanto microrganismos estão sujeitos a inúmeras fontes de contaminação, como por exemplo, o solo e a água (ALMEIDA, 2007).

A introdução de metais pesados em várias formas no ambiente pode produzir modificações consideráveis nas atividades das comunidades microbianas. Os metais pesados geralmente exercem uma ação inibidora sobre os microrganismos, bloqueando grupos funcionais essenciais, deslocando íons metálicos essenciais, ou modificando as moléculas biológicas. Em ambientes poluídos, a resposta dos microrganismos aos metais pesados depende da concentração, da disponibilidade dos metais, e também

das ações de processos complexos controlados por fatores como o tipo do metal e a natureza das espécies microbianas (HASSEN, et al, 1997).

A utilização de bactérias resistentes a metais pesados como indicadores de poluição ambiental tem sido cada vez mais utilizada, tornando-se uma ferramenta sensível e segura na detecção da toxicidade que pode ser letal desses compostos. Essa ferramenta também possibilita uma melhor visão sobre os perigos potenciais associados com a eliminação de efluentes indústrias no meio ambiente (HASSEN, et al, 1997).

Introdução de altas concentrações de metais pesados no meio ambiente mata a maioria da microflora, criando assim a pressão seletiva para emergência de algumas estirpes com resistência aos metais. Essas cepas resistentes participam do processo de auto recuperação do habitat contaminado através de uma variedade de mecanismos, tais como a diferença na aceitação e no transporte do metal tóxico, enquanto em outros casos os metais podem ser transformados enzimaticamente por oxidação ou redução em espécies químicas que podem ser menos tóxicos ou mais voláteis do que o composto original (OWOLABI, HEKEU, 2015).

O mecanismo de resistência ao metal pode ocorrer de duas formas. A primeira forma seria a acumulação e associação da proteína de metal, e a segunda forma seria o bloqueio da parede celular e dos sistemas de transporte de membrana. Estes mecanismos são às vezes codificados em genes de plasmídeo em estreita proximidade com genes de resistência á antibióticos facilitando, assim, a resistência de transferência de metal tóxico a partir de uma célula para outra e resistência cruzada a ambos os metais pesados e antibióticos (ALMEIDA, 2007; OWOLABI, HEKEU, 2015).

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O Lago Igapó localiza-se na microbacia hidrográfica do Ribeirão Cambé, no município de Londrina – PR. A princípio o Lago foi projetado como uma solução para um problema de drenagem urbana do Ribeirão Cambé, dificultada por uma barragem natural (BARROS et al, 2008). A nascente do Ribeirão Cambé está localizada entre o trevo de Londrina – Cambé e São Paulo - Curitiba, e atravessa a cidade no sentido noroeste-sudeste por uma extensão de 21,5 km até atingir o Ribeirão Três Bocas, que finalmente deságua no rio Tibaji (MAEDA, 2008; LONDRINA, 2015).

No presente estudo foram coletadas amostras do Lago Igapó I, II e III (Figura 1), em cada lago coletaram-se amostras em dois lugares diferentes, o primeiro em uma área utilizada para lazer, especificamente para banho, e a segunda em uma área mais afastada do primeiro ponto, onde não é utilizado por nenhuma atividade de lazer, totalizando assim, 6 amostras. Não houve coleta no Lago Igapó IV devido ao intenso assoreamento, e não havendo lugares acessíveis para realizar a coleta.



**Figura 1:** Localização dos Lago Igapó 1, 2, 3, na cidade de Londrina – PR  
**Fonte:** Google earth, 2014.

O Lago Igapó I foi denominado o ponto 1, esse lago compreende a barragem do Ribeirão Cambé até Avenida Higienópolis. Os afluentes desse lago são o Córrego Leme e o Córrego Capivara. Os primeiro ponto escolhido foi a área utilizada para o lazer pela população, após a barragem, no qual além de ser utilizada para a recreação, também é utilizada para lavagem de veículos (Figura 2). E o segundo ponto foi em uma área mais afastada da barragem, em que não há indícios de contato primário pela população.



**Figura 2:** Pontos de Coleta do Lago Igapó I. (A) Ponto em área de recreação. (B) Ponto em área afastada (seta).

**Fonte:** CMB; Souza, 2012.

O Lago Igapó II foi denominado o ponto 2, esse lago inicia na Avenida Higienópolis e termina na rua Prefeito Faria Lima. Seus afluentes são o Córrego Água Fresca e o Córrego Colina Verde. O primeiro ponto de coleta foi próximo a Avenida Higienópolis, no qual é utilizado como área de recreação para algumas pessoas. E o segundo ponto de coleta desse lago foi em uma área mais afastada (Figura 3).



**Figura 3:** Pontos de coleta do Lago Igapó 2  
**Fonte:** Google Earth, 2015.

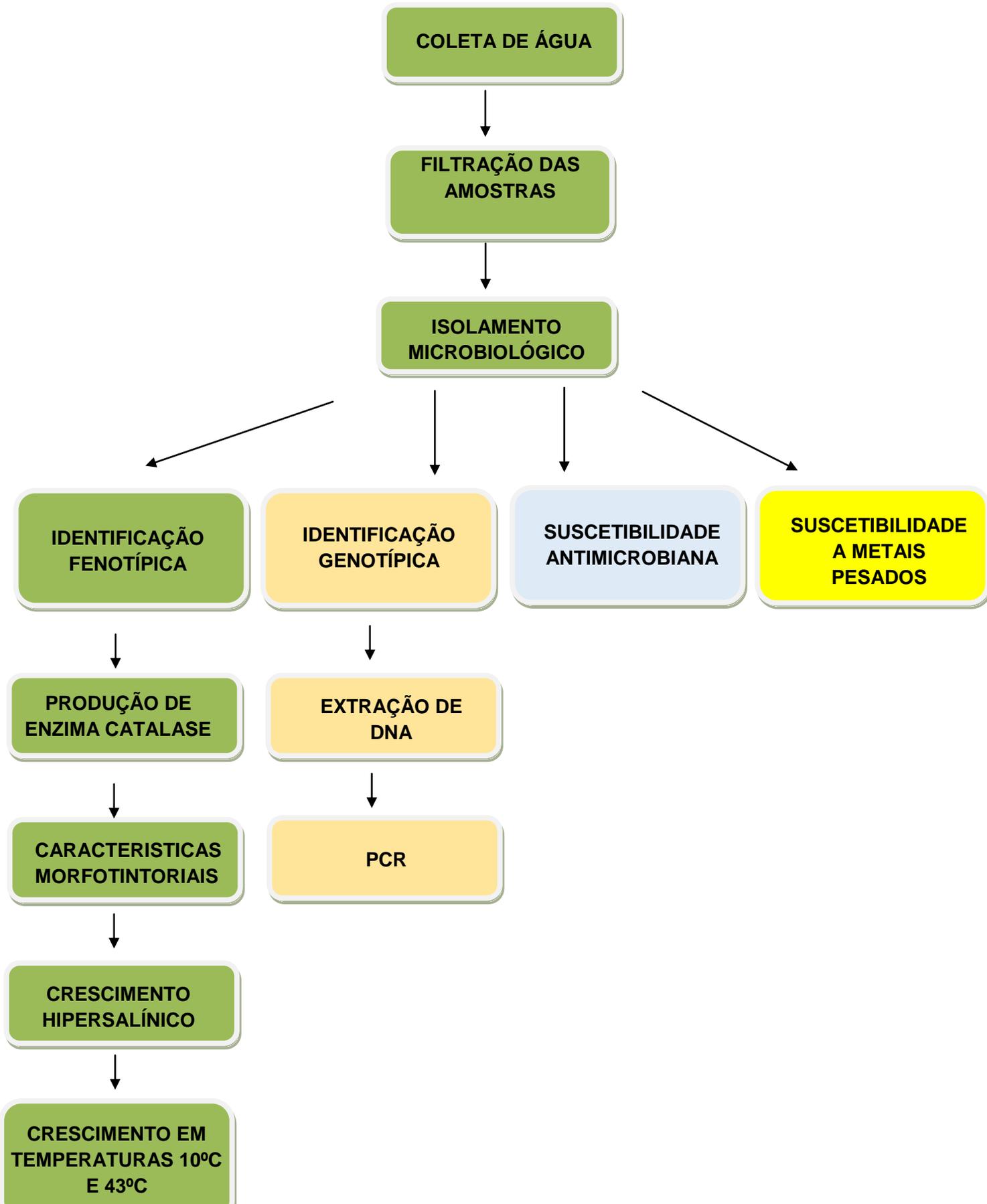
E por fim, o ponto 3 foi o Lago Igapó III, que começa na rua Prefeito Faria Lima e termina na Avenida Castelo Branco. O afluente desse lago é o Córrego Rubi. O primeiro ponto foi em uma área utilizada para o lazer, normalmente é utilizada por crianças para a recreação, próximo a Avenida Castelo Branco. E o segundo ponto foi em uma área mais afastada (Figura 4).



**Figura 4:** Pontos de coleta do Lago Igapó III.  
**Fonte:** Google Earth, 2015

## 5.2 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA

A figura 5 apresenta o fluxograma de metodologias utilizadas no presente estudo, no qual serão detalhadas nos próximos capítulos.



**Figura 5:** Fluxograma de Metodologias.  
**Fonte:** Autoria própria

### 5.3 COLETA DA ÁGUA

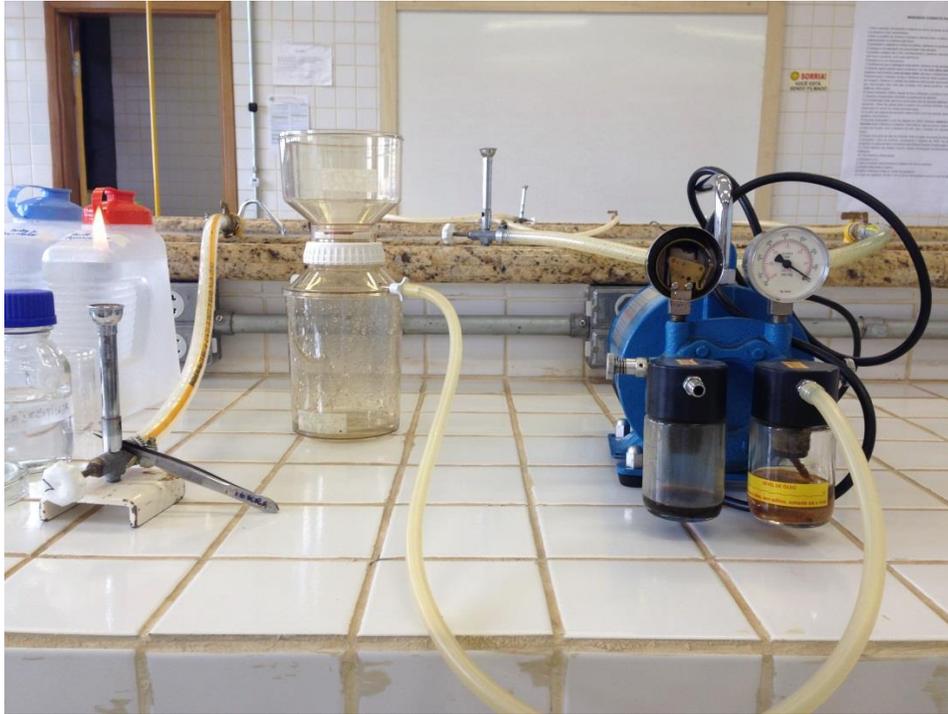
A coleta de água foi realizada em garrafas de plástico devidamente desinfetadas e tratadas com tween 80 (Polisorbato 80). Primeiramente foi realizado o processo de aclimatação da garrafa com o local da coleta, para isso a garrafa foi levada até a superfície do rio e aprofundada um pouco para coleta de uma pequena quantidade de água em toda a garrafa para prosseguir com a coleta.

Seguindo os procedimentos descritos no *Standard Methods for the Examination of Wast and Wastewater* (2012), a garrafa foi colocada dentro do rio, no sentido contrário da correnteza, para que fosse possível coletar os microrganismos presentes no ambiente. As amostras foram coletadas nas margens do lago. Após ter completado o volume da garrafa, ela foi tampada e acondicionada em uma caixa térmica com gelo, para não perder as características do ambiente. Com a conclusão da coleta de água em todos os pontos especificados, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia da UTFPR.

### 5.4 TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE

A Técnica da Membrana Filtrante foi utilizada para o isolamento de *Enterococcus sp*, conforme descrita no *Standard Methods for the Examination of Wast and Wastewater* (2012).

Nesse trabalho foi realizada a filtração em sistema de bomba de vácuo contendo membrana filtrante estéril de porosidade 0,45 µm e um diâmetro de 47 mm (Figura 5).



**Figura 6:** Sistema de filtração com adaptação ao kitossato e bomba de vácuo.  
**Fonte:** IMBRIANI, 2013.

Para cada amostra foi filtrado um volume de 100 mL da água coletada, e após a filtração foi retirada a membrana e depositada no meio específico para a bactéria a ser analisada.

## 5.5 ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO

Para o isolamento microbiológico, as membranas filtrantes foram depositadas no meio de cultura Ágar Kanamicina Azida (KEA), que é o meio específico para isolamento de *Enterococcus*. Em seguida foram selecionadas aleatoriamente 30 colônias de *Enterococcus sp* e essas colônias foram estocadas em meio BHI para posteriormente realizar os testes fenotípicos.

## 5.6 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Para identificação quanto ao gênero, as mostras bacterianas foram submetidas aos testes fisiológicos convencionais: produção de enzima catalase, observações das características morfotintoriais em esfregaços pelo método de Gram, crescimento em temperatura de 10°C e 45°C, seguindo recomendações de Facklam et al. (1999).

### 5.6.1 Produção de enzima catalase

A produção da enzima catalase foi verificada pela metodologia convencional, em lâmina de vidro. A partir do crescimento em ágar BHI (cultura de 16 a 18h à 37°C), uma gota de peróxido de hidrogênio (3% v/v) foi depositada sobre uma suspensão bacteriana. A ausência de formação de bolhas indicou reação negativa, característica dos enterococos.

### 5.6.2 Características morfotintoriais

Após o crescimento bacteriano em ágar BHI, foi procedido o esfregaço em lâminas de vidro e estes foram submetidos ao método Coloração de Gram. Para realizar a Coloração de Gram foram utilizadas as colônias que foram caracterizadas como catalase negativa.

O teste de Coloração de Gram separa as amostras bacterianas em Gram-positivo e Gram-negativo. Primeiramente o esfregaço foi coberto com solução cristal-violeta por um minuto, depois foi lavado com água destilada e coberto novamente com solução mordente por mais um minuto, prosseguiu-se a lavagem como feita com a solução cristal-violeta, foi realizado esse mesmo procedimento para as soluções de

etanol absoluto e em seguida foi secado levemente com papel filtro e ao ar para então examinar com objetiva de imersão.

As características morfológicas das células foram observadas no microscópio óptico com auxílio de objetiva de 100X. As amostras que foram apresentadas com características de cocos Gram-positivos, aos pares, isolados ou em pequenas cadeias foram submetidos aos demais testes para a caracterização do gênero *Enterococcus*.

#### 5.6.3 Crescimento em presença de 6,5% de NaCl

No teste em crescimento hipersalínico foi adicionado 20 microlitros do inóculo em caldo BHI contendo NaCl e incubado a 37°C por 18 horas, após esse período foi observado o crescimento do microrganismo. Esse crescimento notável através de uma mudança de cor no tubo.

#### 5.6.4 Crescimento em pH 9.6

Para verificar o crescimento do microrganismo em pH 9.6 foram adicionados 0,02 mL do inóculo em caldo BHI com o pH ajustado e incubado a 37°C por 18h.

#### 5.6.5 Crescimento em temperatura de 10°C e 45°C

Os testes de temperaturas foram realizados através do crescimento bacteriano em meio BHI, incubados a 10°C e também a 45°C por 24 horas. Após a caracterização quanto ao gênero *Enterococcus*, os inóculos caracterizados com esse gênero foram colocados em tubos eppendorf, contendo caldo BHI adicionado 40% de glicerol e

armazenado a baixas temperaturas, visando manter suas características fenotípicas e genéticas.

## 5.7 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

A identificação genotípica foi realizada pela técnica Reação em Cadeia de Polimerase, para ampliação do gene para determinação da *Enterococcus* sp seguindo a metodologia estabelecida por Jacson et al. (2004). Para essa técnica, primeiramente temos que realizar a Técnica de Extração de DNA, na qual foi realizada por fervura.

Para a extração do DNA foi inoculado as colônias de *Enterococcus* em 3mL de BHI e incubados a 37°C por 18 horas. Após o crescimento, foi centrifugado 1,5 mL em tubo eppendorf a 12.000 rpm por 10 minutos, e foi descartado o meio de cultura. O material restante (*pellet*) foi preenchido com 1,5 mL de água deionizada e esterilizada e centrifugou-se novamente como explicado anteriormente (12.000 rpm por 10 min). Em seguida, acrescentou-se 100 µL de água deionizada e esterilizada e levaram-se as amostras em banho a 100°C por 30 minutos. Após esse tempo, foi colocado as amostras em banho de gelo por 3 minutos, centrifugou as amostras novamente, a 12.000 rpm por 20 minutos, e coletou-se 50 µL do sobrenadante no qual foi congelado, pois ali continha o DNA de cada amostra da bactéria.

Depois de extraído o DNA, foi realizado o procedimento de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para identificação do gênero da bactéria pela amplificação do gene *tuf*, amplificação para identificação das espécies: *E. gallinarum*, *E. casselivlafus*, *E. flavences*, *E. faecium*, *E. faecalis*.

Para a reação de 20 µL em cada tubo foram utilizados: 2 µL de solução tampão, 1 µL de CIMg, 1,4 µL de DNTP, 1 µL de Primer F, 1 µL de Primer R, 0,5 µL de Taq polimerase, 2 µL de DNA da extração de cada amostra e 11 µL de água Mili Q estéril. Para realizar a amplificação foi utilizado o aparelho termociclador, onde a temperatura que estava estabelecida era de 34°C por 5 minutos. Realizou-se 30 ciclos e cada ciclo equivalia a 94°C por 30 segundos, 55° por 30 segundos e 72°C por mais 30 segundos.

Após os 30 ciclos as amostras passaram por um período de extensão a 72°C por 10 minutos e em seguida se encontraram na temperatura de 4°C. Depois dessa etapa, as amostras foram amplificadas em gel agarose a 1,5%, coradas com uma solução indicadora e reveladas em luz ultravioleta. A tabela 1 a seguir apresenta os oligonucleotídeos indicadores empregados para a confirmação do gênero e identificação das espécies e os genes de resistência para *Enterococcus*.

**Tabela 1** – Oligonucleotídeos iniciadores empregados para confirmação do gênero, identificação das espécies e genes de resistência a vancomicina e tetraciclina em *Enterococcus* sp

	<b>Gene</b>	<b>Sequência Nucleotídica (5'- 3')</b>	<b>Produto (pb)</b>
<b><i>Enterococcus spp</i></b>	<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112
<b><i>E. gallinarum</i></b>	<i>vanC-1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822
<b><i>E. casseliflavus/ E. flavescens</i></b>	<i>vanC-2/vanC-3</i>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	439
<b><i>E. faecalis</i></b>	<i>ddl<sub>E.faecalis</sub></i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	941
<b><i>E. faecium</i></b>	<i>ddl<sub>E.faecium</sub></i>	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	550

## 5.8 SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

A suscetibilidade a antimicrobianos foi realizada pela técnica de disco-difusão, conforme estabelecido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2012). A técnica foi realizada seguindo os seguintes passos: foram cultivados 30  $\mu\text{L}$  do estoque em 3 mL de BHI e inoculado por 18 horas a 37°C, ajustou-se em seguida, o número celular, adicionando alíquotas do cultivo a 3 mL de água destilada e esterilizada até que fosse atingido a turbidez do tubo de 0,5 da escala de Mc Farland. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do cultivo ajustado em placa de Petrim contendo 15 mL de Agar Mueller Hinton e semeado em todos os sentidos da placa utilizando *swab*. Em seguida, adicionaram-se

em cada placa cinco discos de diferentes antimicrobianos, respeitando o espaçamento entre os discos.

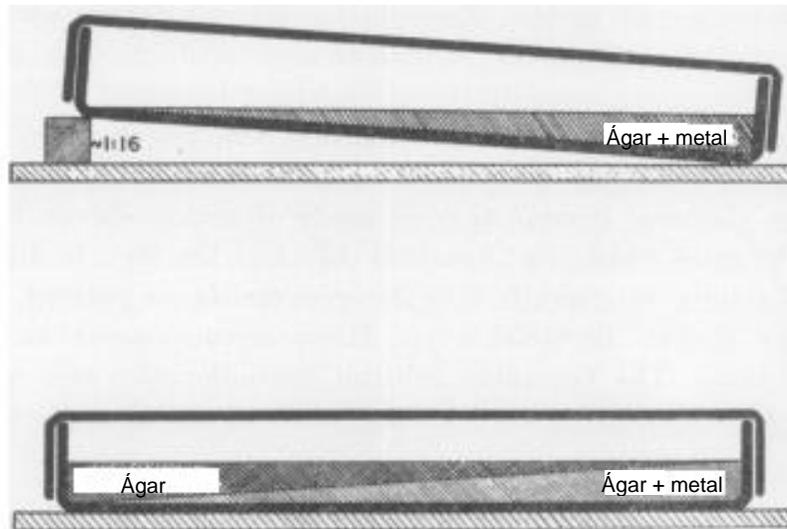
Os antimicrobianos utilizados foram: Gentamicina (10 µg), Ampicilina (10µg) , Vancomicina (30µg), Norfloxacin (10µg), Cloranfenicol (30µg), Eritromicina (15µg), Estreptomicina (10µg), Tetraciclina (30µg) , Penicilina (10µg) e Ciprofloxacina (5µg).

Após essa etapa, as placas foram incubadas a 37°C por 18 horas, com exceções das placas com vancomicina que foram incubadas por 24 horas. Transcorrido o período de incubação foi medido o diâmetro do halo com régua e anotado os resultados, esses resultados foram comparados com os dados do CLSI e classificado de acordo com a sua aceitabilidade em sensível, intermediário e resistente.

## 5.9 SUSCETIBILIDADES A METAIS PESADOS

Na identificação de resistência a metais pesados foi realizada a técnica de suscetibilidade de metais pesados em placa gradiente, conforme estabelecido por Szybalski e Bryson (1952) com modificações.

A placa gradiente foi montada com a adição de um lado da Placa de Pedri com o meio de cultura BHI mais a concentração do metal pesado, conforme estabelecido na legislação. E o outro lado da placa com o meio de cultura puro. Depois de preparado a placa, foi transferida as colônias para a placa gradiente em forma de linhas. A placa possibilitou a amostra de um gradiente de concentração, o que quer dizer que o lado com o metal podemos identificar como resistente ao metal e o lado sem metal, sensibilidade ao metal (Figura 6).



**Figura 7:** Esquemática da técnica de suscetibilidade de metais pesados em placa gradiente.  
**Fonte:** SZYBALSKI; BRYSON, 1952.

Os metais utilizados foram o Cobre, Chumbo e Zinco, e suas concentrações foram estabelecidas conforme a Resolução CONAMA 357, de 17 de Março de 2005. Essa lei dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

As concentrações foram estabelecidas de acordo com a classe do corpo hídrico, então a portaria SUREHMA n.º 3 de 21 de março de 1991, em seu artigo 2º n.º inciso III, considera o Ribeirão Cambé e seus afluentes, contribuinte da margem esquerda do Rio Tibagi do município de Londrina, até o Parque Arthur Thomas, pertence a classe 1.

A tabela 1 apresenta as concentrações estabelecidas pela legislação em mg/L e em g/L.

**Tabela 2 –** Concentrações mínimas de metais pesados .

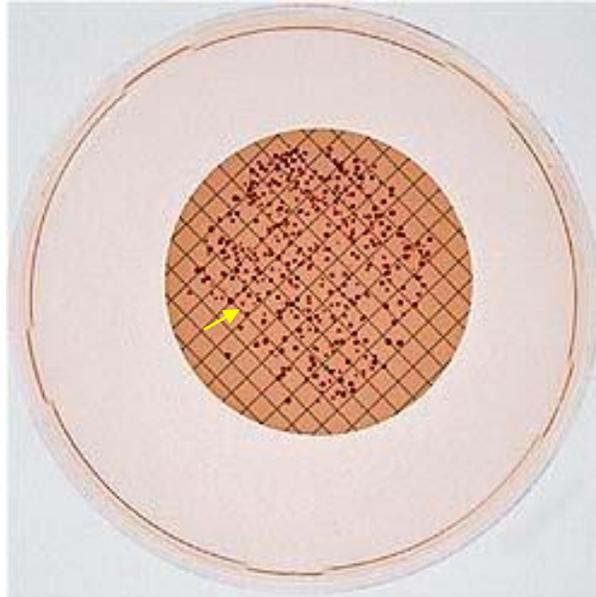
<b>Concentrações dos metais - CONAMA 357</b>		
	mg/L	g/L
<b>Cobre</b>	0,009	0,000009
<b>Chumbo</b>	0,01	0,00001
<b>Zinco</b>	3,24	0,00324

**Fonte:** Autoria própria.



## 6. RESULTADOS

Colônias típicas de *Enterococcus* sp em ágar KEA aparecem na coloração negra das colônias, em decorrência da quebra da esculina em esculitina, seguida de enegrecimento do Fe (Figura 7).



**Figura 8:** Coloração característica de *Enterococcus* em ágar KEA. Seta indica as colônias negras identificadas como *Enterococcus*.

**Fonte:** MAIA-FURLANETO, 2015

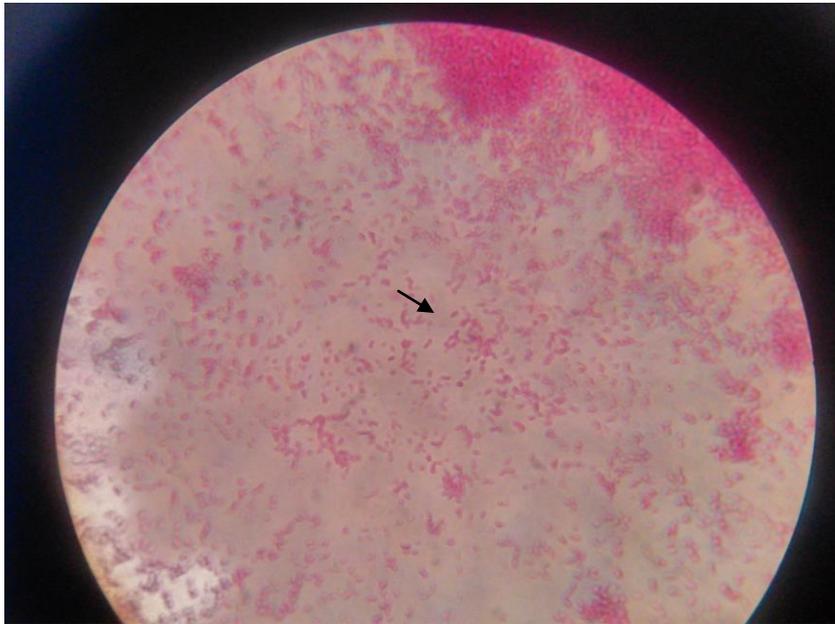
Os resultados obtidos nos testes bioquímicos para a identificação fenotípicas foram positivos para *Enterococcus* sp em todas as amostras analisadas (Tabela 2).

**Tabela 3:** Resultados dos testes fenotípicos de identificação de *Enterococcus* sp.

<b>Amostra</b>	<b>Isolado</b>	<b>Gram</b>	<b>Catalase</b>	<b>pH 9,6</b>	<b>NaCl 6,5%</b>	<b>10°C</b>	<b>45°C</b>
<b>Lago Igapó I (Barragem-recreação)</b>	<b>1</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>2</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>3</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>4</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>5</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>6</b>	+	-	+	+	+	+
<b>Lago Igapó I (Barragem)</b>	<b>7</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>8</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>9</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>10</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>11</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>12</b>	+	-	+	+	+	+
<b>Lago Igapó II ( Corrida-Recreação)</b>	<b>13</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>14</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>15</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>16</b>	+	-	+	+	+	+
<b>Lago Igapó II (Corrida)</b>	<b>17</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>18</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>19</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>20</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>21</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>22</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>23</b>	+	-	+	+	+	+
<b>Lago Igapó III (Aterro-Recreação)</b>	<b>24</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>25</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>26</b>	+	-	+	+	+	+
<b>Lago Igapó III (Aterro)</b>	<b>27</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>28</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>29</b>	+	-	+	+	+	+
	<b>30</b>	+	-	+	+	+	+

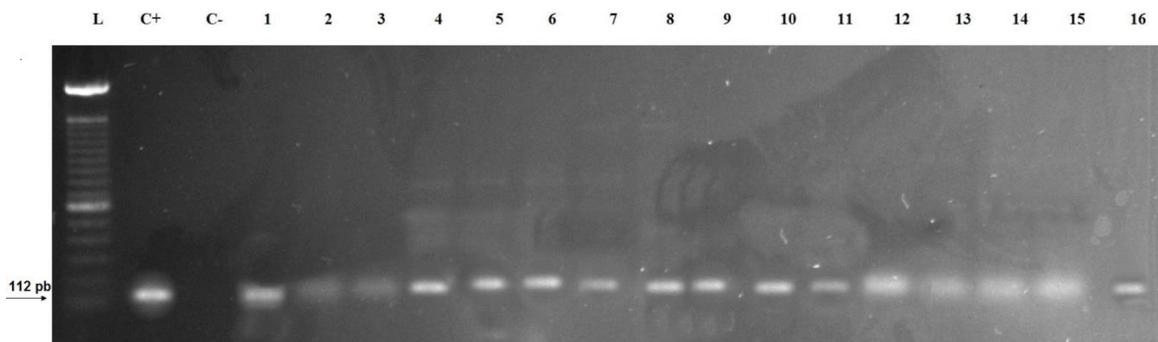
**Fonte:** Autoria própria.

Na Figura 8 é possível observar as características mencionadas no método de coloração de Gram, a morfologia de todas as amostras isoladas foram cocos gram-positivos e em cadeias curtas.



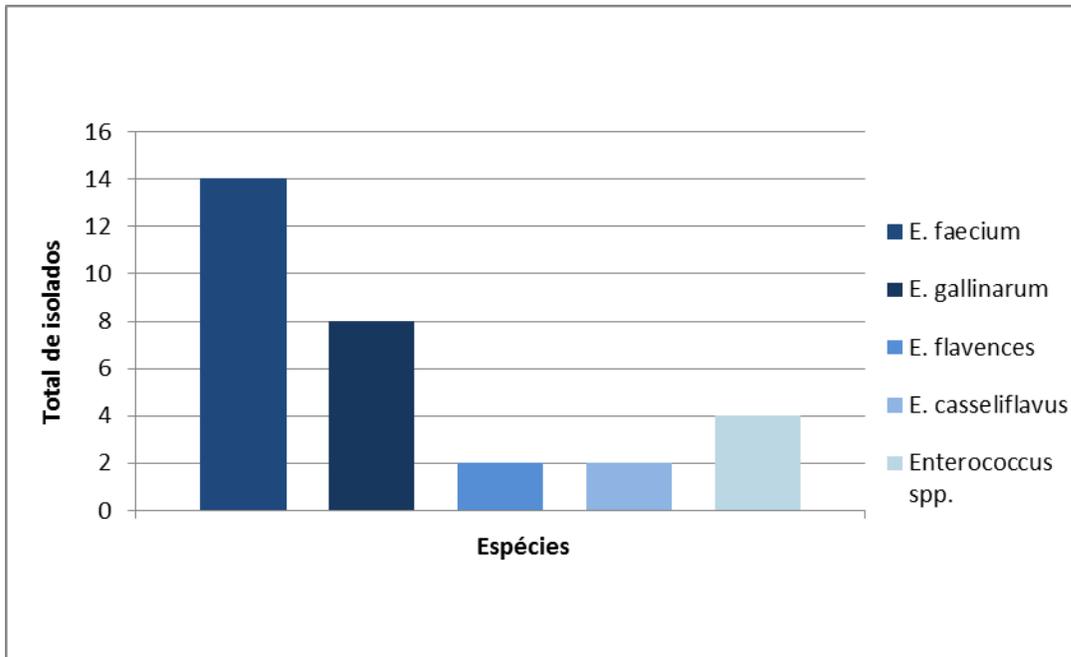
**Figura 9:** Características morfológicas de *Enterococcus* sp (seta).  
**Fonte:** Autoria própria.

Depois de identificados todos os resultados nos testes fenotípicos prosseguiram-se com a identificação genotípica. Através da PCR foram encontrados como resultado que 100% dos isolados pertenciam ao gênero *Enterococcus* (Figura 9).



**Figura 10:** Gel representativo para confirmação do gênero. Amplificação na região de peso molecular de 112 pb (seta). L: marcador de peso molecular 100 pb; C+: controle positivo e C-: controle negativo.  
**Fonte:** Autoria própria.

Dos 30 isolados testados, 47% foram identificados como *E. faecium*, 26,7% *E. gallinarum*, 6,7% *E. casseliflavus*/*E. flavences* e 13,33% *Enterococcus* spp. (Figura 10).

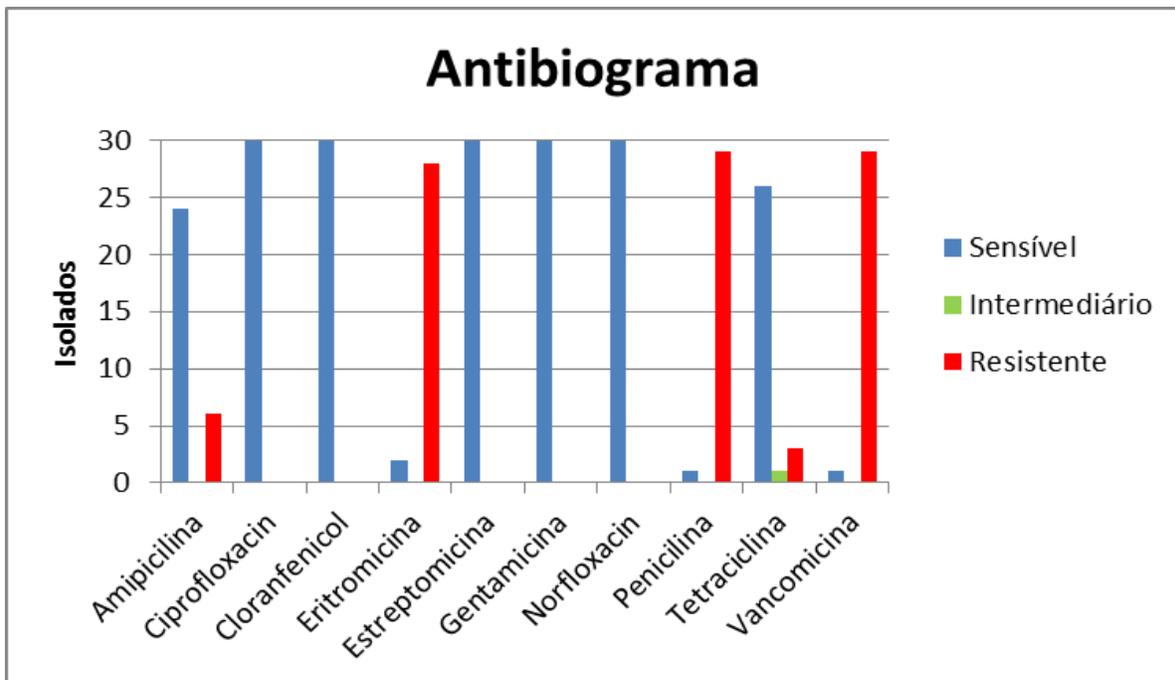


**Figura 11:** Frequência de espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

**Fonte:** Autoria própria.

As espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* são frequentemente isoladas do intestino humano, apesar de serem consideradas relativamente não virulentas e raramente estarem associadas a doenças humanas, mas destacam-se por apresentar resistência intrínseca a vancomicina. Já as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são encontradas em concentrações elevadas no intestino de seres humanos. Diante dos resultados apresentados na identificação genotípica, vimos que não foram identificadas espécies *E. faecalis*, já que essa espécie é considerada a mais frequentemente envolvida com as infecções enterocócicas em seres humanos (80% à 90%). Mas as espécies *E. faecium*, que foi a espécie mais encontrada nesse trabalho está associada à maioria das infecções provocadas por amostras resistentes aos antimicrobianos, inclusive a vancomicina, ela representa de 5% à 10% de infecções enterocócicas em seres humanos (MURRAY et al, 2011; FRACALANZZA, 2007).

O resultado do perfil de suscetibilidade das espécies de *Enterococcus* sp. isoladas do Lago Igapó estão apresentados na Figura 11. É possível notar que 100% das espécies foram sensíveis a gentamicina, norfloxacin, cloranfenicol, estreptomicina e ciprofloxacina. Já os resultados de resistência obtiveram que: 96,7% dos isolados foram resistentes à vancomicina e penicilina; 93,3% dos isolados foram resistentes a eritromicina; 10% a tetraciclina; e 20% a ampicilina.



**Figura 12:** Suscetibilidade de *Enterococcus* a antimicrobianos de uso clínico.

**Fonte:** Autoria própria.

Foi observado que diversos isolados apresentaram resistência a mais de dois antimicrobianos testados, o que caracteriza assim a multirresistência das amostras analisadas e identificadas como pertencentes ao gênero *Enterococcus*. Conforme mencionado por Henkes (2010) as bactérias *Enterococcus* possuem resistência à vancomicina, teicoplanina, penicilina, e esse fato colaboram com os resultados encontrados nesse estudo. O mesmo autor ainda afirma que enterococos também apresentam genes de resistência à estreptomicina e gentamicina, mas nesse estudo nenhuma amostra foi resistente para esses antibióticos.

Enterococos resistentes a antimicrobianos isolados em água tem sido relatado em estudos no Brasil e também em outros países (CHEE-SANFORD et al. 2001; SILVA et al. 2005; NACHTIGALL et al. 2013). Nesse trabalho obteve-se aproximadamente 93% dos isolados resistentes à eritromicina, Nachtigall et al. (2013) em seus isolados de enterococos das águas do Arroio Dilúvio em Porto Alegre, apresentou 81% de resistência a esse mesmo antibiótico, o que é considerada uma elevada resistência. A resistência dessas espécies à eritromicina é muito preocupante, uma vez que esse antibiótico é a principal alternativa para o tratamento de infecções por enterococos em pacientes alérgicos à penicilina.

A alta resistência dos isolados à vancomicina apresentado nesse trabalho (96,7% de isolados resistentes) é um fator bastante peculiar, já que esse resultado difere de vários autores, no qual não encontraram nenhuma bactéria do gênero *enterococcus* com resistência a esse antibiótico, ou foi encontrada a resistência, mas em pequena porcentagem de isolados, em ambientes aquáticos (MOORE et al. 2008; CHEE-SANFORD et al. 2001; NACHTIGALL et al. 2013; FURTULA et al. 2013). A resistência a vancomicina vem comprometendo seriamente o uso dela para o tratamento de infecções enterocócicas, e as implicações médicas se tornam graves na medida em que essa resistência se torna altamente disseminada, como é o caso das bactérias isoladas no Lago Igapó.

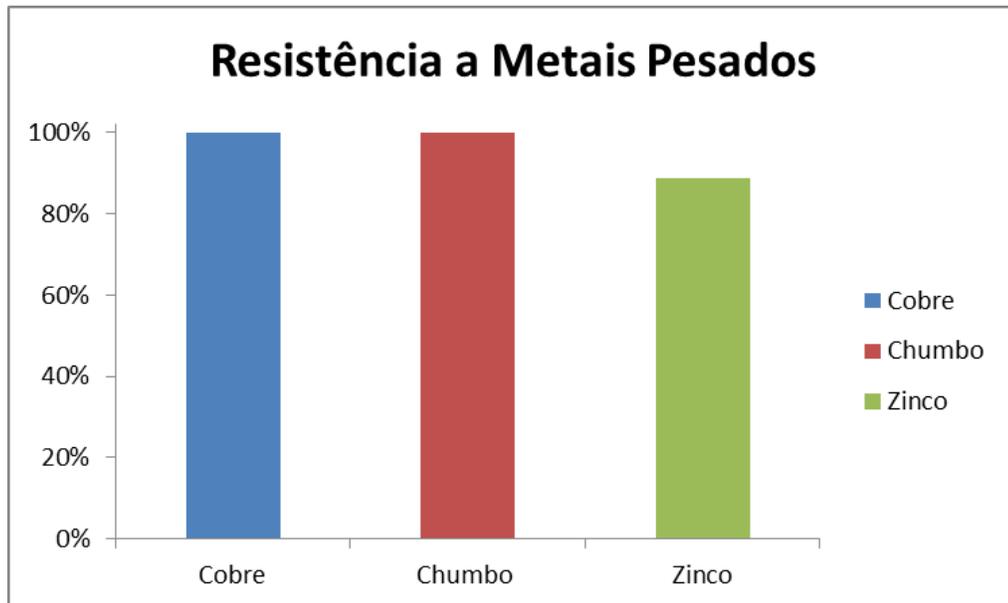
Em relação aos resultados de suscetibilidade de *Enterococcus* à metais pesados, notamos que a maioria das amostras apresentou-se resistente aos três metais pesados testados.

Depois de incubado a placa gradiente com a linha de inóculo das amostras, foi possível observar que na maioria das placas ocorreu o crescimento em toda a linha (Figura 12), tanto do lado mais concentrado de metal pesado como do lado com menor concentração. Isso mostra que as bactérias de enterococos isoladas são resistentes aos metais testados.



**Figura 13:** Crescimento de *Enterococcus* na Placa Gradiente contendo metal pesado.  
**Fonte:** Autoria própria.

Somente duas amostras não cresceram na placa de zinco, o que resultou em 100% de resistência para o chumbo e o cobre e 89% de resistência para o zinco (Figura 13).



**Figura 14:** Suscetibilidade a metais pesado.

**Fonte:** Autoria própria.

Os resultados parciais de resistência a metais pesados, podem possibilitar discutir dois resultados. O primeiro é a contaminação do Lago Igapó por metais pesados, e o segundo é a biorremediação desses metais por bactérias *Enterococcus* no lago.

Os três lagos estudados nesse trabalho apresentam uma concentração de metais pesados maior do que a mínima exigida pela Resolução CONAMA 357, o que representa uma contaminação do ambiente. Os três metais, cobre, chumbo e zinco trazem problemas sérios à saúde humana. As atividades industriais têm introduzido metais pesados nas águas em uma quantidade muito maior do que estipuladas na legislação, causando assim grandes poluições, além do que a água é um veículo de transmissão de doenças, fato esse de grande preocupação com a saúde da população e com o meio ambiente, já que o Lago Igapó é utilizado por diferentes atividades, pesca banho, esportes náuticos, ocasionando uma disseminação da contaminação.

Vários estudos mostram que a maior concentração de metais no ambiente provoca um aumento da tolerância a antibióticos da comunidade bacteriana (Volesky,

2000; Pennanem et al., 1995; Baath et al, 1998;). As bactérias tem uma grande facilidade de adsorver e acumular íons metálicos e de desenvolver variadas estratégias de tolerância a estes. Devido a pressão seletiva destes contaminantes, as bactérias têm adquirido mecanismos de resistência que incluem a exclusão por barreira de permeabilidade, transporte ativo, bombas de efluxo, desintoxicação enzimática, redução da sensibilidade dos alvos celulares íons metálicos. Estes resultados demonstram a existência de bactérias resistentes ao cobre, chumbo e o zinco na água, uma vez que a adição do metal ao meio não permitiria o crescimento de bactérias para esses metais tóxicos.

Esses mecanismos biológicos de defesa que as bactérias desenvolvem podem ser considerados como uma técnica de biorremediação natural do ambiente (o processo está acontecendo naturalmente, não houve a inserção das bactérias para a descontaminação), através da bioacumulação, na qual as bactérias internalizam os íons metálicos por meio de transporte ativos. Esse processo, conforme mencionado por Schenberg (2010), é valido para a descontaminação de águas poluídas com metais pesados.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo foi desenvolvido visando analisar a qualidade da água do Lago Igapó através de bactérias *Enterococcus* como indicadoras de contaminação fecal, esse trabalho alcançou os objetivos esperados pois apresentou os seguintes resultados: 100% dos isolados pertenciam ao gênero *Enterococcus*, Dos 30 isolados 47% foram identificados como *E. faecium*, 26,7% *E. gallinarum*, 6,7% *E. casseliflavus/E. flavences* e 13,33% *Enterococcus spp.*. Quanto à suscetibilidade a antimicrobianos 100% das espécies foram sensíveis a Gentamicina, Norfloxacin, Cloranfenicol, Estreptomicina e Ciprofloxacina. Já os resultados de resistência obtivemos que: 96,7% dos isolados foram resistentes a Vancomicina, Penicilina; 10% a Tetraciclina e 20% a Amipicilina, podemos afirmar através desses resultados de suscetibilidade antimicrobiana que as bactérias *Enterococcus* apresentam uma multirresistência. E quanto aos resultados de resistência a metais pesados obtivemos que 100% das amostras foram resistentes ao cobre e chumbo e 88% foram resistentes ao zinco.

Diante dos resultados apresentados nesse estudo, podemos concluir que os objetivos foram alcançados, pois foi possível isolar e identificar a presença de *Enterococcus sp* nos três lagos. Além do mais, as amostras isoladas dessa bactéria apresentaram resistência a uma ampla gama de antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento de infecções enterocócicas dificultando a terapêutica e prejudicando não só a saúde das pessoas que utilizam o lago, mas também a vida aquática presente nesse ambiente.

## REFERÊNCIAS

AHMED, W.; HODGERS, L.; SIDHU, J.P.S.; TOZE, S. **Fecal Indicators and Zoonotic Pathogens in Household Drinking Water Taps Fed from Rainwater Tanks in Southeast Queensland, Australia**. Applied and Environmental Microbiology. v. 78. jan. 2012.

ALMEIDA, Fernanda dos S. **Espécies do grupo *Bacteroides fragilis* em bezerros com e sem diarreia aguda: ocorrência, fatores de virulência e caracterização molecular**. 2007. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências Microbiológica). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

AMARAL, Ana Luísa P. **Microrganismos Indicadores de Qualidade De Água**. 2007. 40 f. Monografia (Pós-Graduação em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Wast and Wastewater**. 22. ed. Washington: APHA, 2012. 1496 p.

BAATH, Erland; DIAS-RAVINA, Monteserrat; forstegard, Asa; COMPBELL, Colin D. **Effect of metal-rich sludge amendments on soil microbial community**. Applied and Environmental Microbiology. v. 64, n.1, p. 238-245, jan 1998.

BARROS, Mirian. ARCHELA, Rosely. BARROS, Omar. THERY, Hervé. MELLO, Neli. GRATÃO, Lúcia. **Curso e (Per) curso das águas**. 2008. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/atlasambiental/NATURAL/CURSODASAGUAS.htm>>. Acesso em: 05 nov. 2014.

BERNER, Eduardo A. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. Isoladas em dois hospitais em Porto Alegre**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BORTOLO, Carlos. O Lago Igapó em Londrina – PR: uma leitura das diferentes formas de produção do espaço da cidade. **Revista Percorso – NEMO**. Maringá, v.2, n.2, p. 47-72, 2010.

BRAGA, Benedito et al. **Introdução a Engenharia Ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRANCO, Rita; CHUNG, Ana Paula; VERÍSSIMO, Antonio; MORAIS, Paula V. **Impact of chromium contaminated wastewaters on the microbial community of a river**. FEMS Microbiology Ecology. v.54, p-35-46, 2005.

BRASIL. Lei nº 6.938, de 31 de Agosto de 1981. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2 nov. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l6938.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6938.htm)>. Acesso em: 07 de nov. 2014.

BRASIL. Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 mar. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 21 de maio de 2015.

BUSS, Daniel F; BAPTISTA, Darcílio F; NESSIMIAN, Jorge L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, p. 465-473, mar-abr, 2003.

BYAPPANAHALLI, Muruleedhara N; NEVERS, Meredith B; KORAJKIC, Asja; STALEY, Zachery R; HARWOOD, Valerie J. **Enterococci in the Environment**. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 76, n.4, p. 685-706, dec. 2012.

CHEE-SANFORD, J.C; AMINOV, R.I; KRAPAC, I.J; GARRIGUES-JEANJEAN, N; MACKIE, R.I. **Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in Lagoons and Groundwater underlying two swine production facilities**. Applied and Environmental Microbiology. v. 67, n. 4, p. 1494-1502, abr. 2001.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**.v.32, n.3, jan. 2012.

CMB – Mineração e Meio Ambiente. **Planejar para a chuva não levar**. Disponível em: <<http://www.cmbconsultoria.com.br/planejar-para-chuva-nao-levar/>>. Acesso em 20 maio 2015.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANAMENTO AMBIENTAL – CETESB.  
**Monitoramento de *Escherichia coli* e coliformes termotolerantes em pontos da**



Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/29347>>. Acesso em: 01 nov. 2014.

HERINGER, Ana Flávia C; SANTOS, Patricia F.B; TUTUNJI, Valdi, L. **Perfil Sazonal dos *Enterococcus* e *Escherichia coli* nos mananciais do Distrito Federal.** Univ.Ci.Saúde, Brasília, v.5, n.1, p.13-26, 2007.

JACSON,Charlene R; FEDORKA-CRAY, Paula J; BARRET, John B. **Use of a genus and species specific multiplex PCR for identification of Enterococci.** Journal of Clinical Microbiology. v.32, n.8, p.3558-3565, abr. 2004.

LONDRINA. **Bacias Hidrográficas do Município de Londrina.** Disponível em: <[http://www.londrina.pr.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=261&Itemid=205&limitstart=6](http://www.londrina.pr.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=261&Itemid=205&limitstart=6)>. Acesso em: 20 abr. 2015.

LORENZO, Mariana. P. **Caracterização dos impactos ambientais negativos e medidas mitigatórias do processo de assoreamento do lago Igapó, Londrina – PR. 2011.** Trabalho de Conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Gestão Ambiental. Londrina, Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL. 2011, Londrina, 2011.

MAEDA, Karenine S. **O “colar de esmeraldas” da paisagem londrinense.** 2008. 219 f. Dissertação (Mestrado em Arquitetura e Urbanismo) – Faculdade de Arquitetura e Urbanismo, Universidade de São Paulo, 2008

MOORE, D.F; GUZMAN, J.A.; MCGEE, C. **Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water.** Journal of Applied Microbiology. v. 105, p. 1017-1025, mar. 2008.

MOTA, Suetônio. **Introdução à engenharia ambiental.** 4.ed. Rio de Janeiro: ABES, 2006.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica.** 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

NACHTIGALL, Gisele; JESUS, Alyne Gonçalves; ZVOBODA, Dejoara de Angelis; SANTESTEVAN, Naiara Aguiar; MINOTTO, Elisandra; MOURA, Tiane Martin; D’AZEVEDO, Pedro; FRAZZON, Jeverson; DER SAND, Sueli Van; FRAZZON, Ana Paula Guedes. **Diversidade e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de**

***Enterococcus* sp. isolados das águas de Arroio Dilúvio - Porto Alegre, RS, Brasil.** Revista Brasileira de Biociências. v. 11, n.2, p. 235-241, abr-jun 2013.

OWOLABI, Joshua B; HEKEU, Melaine M. **Isolation and characterization of zine resistance bacteria from a coil coating industrial wastewater treatment plant.** International Journal of environmental Science. v.5, n.5, p. 1030-1042, mar. 2015.

PELEGRINO, Erika. Poluição do Lago Igapó é 200 vezes maior do que o tolerável. **Jornal de Londrina**, Londrina, 05 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.jornaldelondrina.com.br/londrina/conteudo.phtml?tl=1&id=1430712&tit=Poluicao-do-Igapo-e-200-vezes-maior-que-o-toleravel>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

PENNANEM, Taina; FORSTEGARD, Asa; FRITZE, Hannu; BAATH, Erland. **Phospholipid Fatty Acid Composition and Heavy Metal Tolerance of Soil Microbial Communities along Teo Heavy Metal- Polluted Gradients in Coniferous Forest.** Applied and Environmental Microbiology. v. 62, n.2, nov. 1995,

RUZON, Flávia I. **Caracterização fenotípica e molecular de fatores de virulência de *Enterococcus faecium* de origem hospitalar.** Dissertação ( Mestrado em Microbiologia). 2009. 66 f. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

SCHENBERG, Ana Clara G. **Biotechnologia e desenvolvimento sustentável.** Estudos Avançados. v. 24, 2010.

SHMIDT, Gisele. **Análise fenotípica e genotípica de *Enterococcus* sp. isolados de frango após subcultura no laboratório.** 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SILVA, Miguel Ferreira; TIAGO, Igor; VERÍSSIMO, António; BOAVENTURA, Rui A. R; NUNES, Olga C; MANAIA, Célia M. **Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant.** FEMS Microbiology Ecology. v. 55, p.322-329, nov. 2005.

SOUZA, Rhay. **Excelente debate sobre a inundação do Lago Igapó.** 2012. Disponível em: <<http://chadascincolondrina.blogspot.com.br/2012/07/excelente-debate-sobre-inundacao-do.html>>. Acesso em 20 maio 2015.

SUREHMA. Portaria nº3 de 21 de março de 1991. Disponível em:  
<<http://www.recursoshidricos.pr.gov.br/arquivos/File/enquadramento-b-tibagi.pdf>>.  
Acesso em: 02 mai. 2015.

SZYBALSKI, Waclaw; BRYSON, Vernon. **Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agentes**. The Biological Laboratory, New York: Cold Spring Harbor. v. 64, p. 489 – 499, abr. 1952.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.

VOLESKY, B. **Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century**. Hidrometallurgy. v. 59, p.203-216, mar. 2000.

VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade da água e ao tratamento de esgoto**. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; UFMG, 2005. 452 p.