

**Sensibilidade a antibióticos e metais pesados em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*
isoladas de diferentes fontes de água do Cariri Cearense, Brasil**

**Antibiotic and heavy metal sensitivity of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*
isolated from different water sources of Cariri Cearense, Brazil**

**Sensibilidad a antibióticos y metales pesados de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*
islados de diferentes fuentes de agua en Cariri Cearense, Brasil**

Recebido: 06/08/2020 | Revisado: 15/08/2020 | Aceito: 18/08/2020 | Publicado: 23/08/2020

Luiz Henrique Cruz Macedo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6315-9137>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Brasil

E-mail: luizcruzmacedo@gmail.com

Maria Lucilene Queiroz da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4040-2288>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Brasil

E-mail: lucilenequeiroz.biomed@gmail.com

João Hermínio da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9518-3206>

Universidade Federal do Cariri, Brasil

E-mail: herminio@fisica.ufc.br

Francisco Rodrigo de Lemos Caldas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5376-849X>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Brasil

E-mail: rodrigo.lemos@ifce.edu.br

Resumo

A resistência a agentes antimicrobianos e metais pesados é resultado da consequência natural da adaptação celular bacteriana à exposição desses contaminantes no ambiente. A investigação da sensibilidade bacteriana a contaminantes ambientais é necessária especialmente devido ao reconhecimento dos impactos que esses podem causar. O presente trabalho isolou cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* de diferentes ambientes aquáticos da Bacia do Salgado - CE e avaliou a sua sensibilidade a antimicrobianos e metais pesados. Doze cepas bacterianas foram isoladas e identificadas e a sensibilidade foi avaliada

pelo método de microdiluição em caldo, com as concentrações variando entre 0,49 – 250 µg/mL para os metais pesados cobre e cromo e 0,25 – 128 µg/mL para os antimicrobianos imipenem, meropenem e ceftriaxona. As cepas de *Klebsiella pneumoniae* demonstraram sensibilidade à ação do imipenem e meropenem, já para a ceftriaxona constatou-se que as cepas provenientes das águas de abastecimento apresentaram maior resistência para esse antimicrobiano. O meropenem foi o antimicrobiano para o qual as bactérias demonstraram maior sensibilidade. Em relação aos metais pesados, as cepas de *E. coli* de água de abastecimento apresentaram ser mais resistentes que as demais. As cepas de *K. pneumoniae* demonstraram maior tolerância que as de *E. coli* para os metais. Além disso, todas as estirpes, de ambas as espécies, apresentaram concentração inibitória mínima inferiores aos valores reportados pela literatura para o cobre e cromo. A menor tolerância aos metais pesados se refletiu na sensibilidade para os antimicrobianos. Os resultados desse estudo exibem perfil de sensibilidade a antimicrobianos e metais pesados adequados sob a perspectiva da saúde pública, todavia, requer atenção sobre a microbiota aquática desses ambientes.

Palavras-chave: Água; Metais; Antibióticos; Resistência bacteriana.

Abstract

Resistance to antimicrobial agents and heavy metals results from the natural adaptation of the bacterial cell to environmental contaminants. Different bacterial strain sensitivity to water contaminants is still not well understood. In the present study, we isolated *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains from aquatic sources in the Salgado Basin in Ceara state, Brazil and, evaluated their sensitivity to antimicrobials and heavy metals. We identified and tested twelve bacterial strains for their sensitivity for copper and chromium using the broth microdilution method (0.49 - 250 µg / mL). We also tested the antimicrobials imipenem, meropenem, and ceftriaxone (0.25 - 128 µg / mL). *Klebsiella pneumoniae* was highly sensitive to imipenem and meropenem. Other strains, from a private water supply, were more resistant to ceftriaxone. Meropenem was the antimicrobial with higher sensitivity. Some strains of *E. coli* (collected from the water supply) are resistant to heavy metals. *K. pneumoniae* strains showed enhanced tolerance for metals. Noteworthy, all strains of both species studied here have a minimum inhibitory concentration (for copper and chromium) lower than the values reported in the literature. These results suggest that water-collected bacterial strains, sensitive to antimicrobials and heavy metals, is appropriate from the perspective of public health, however, require attention to the aquatic microbiota.

Keywords: Water; Metals; Antibiotics; Bacterial resistance.

Resumen

La resistencia a los agentes antimicrobianos y los metales pesados es el resultado de la consecuencia natural de la adaptación de las células bacterianas a la exposición a los contaminantes del medio ambiente. La investigación de la sensibilidad bacteriana a los contaminantes ambientales es necesaria sobre todo por el reconocimiento de los impactos que pueden causar. El presente trabajo aisló cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* de diferentes ambientes acuáticos en la Cuenca Salgado - CE y evaluó su sensibilidad a antimicrobianos y metales pesados. Se identificaron e identificaron doce cepas bacterianas y se evaluó la sensibilidad mediante el método de microdilución en caldo, con las variaciones apropiadas entre 0.49 - 250 µg / mL para metales pesados cobre y cromo y 0.25 - 128 µg / mL para antimicrobianos imipenem, meropenem y ceftriaxona. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* mostraron sensibilidad a la acción del imipenem y meropenem, mientras que para la ceftriaxona se encontró que las cepas del suministro privado de agua eran más resistentes a este antimicrobiano. El meropenem fue el antimicrobiano para las bacterias que mostraron mayor sensibilidad. En relación con los metales pesados, estas cepas de suministro de agua de *E. coli* son más resistentes que las demás. Las cepas de *K. pneumoniae* mostraron mayor tolerancia a los metales que la *E. coli*. Además, todas las cepas, de ambas especies, tienen una concentración inhibitoria mínima inferior a los valores reportados en la literatura para el cobre y el cromo. La menor tolerancia a los metales pesados se reflejó en la sensibilidad a los antimicrobianos. Los resultados de este estudio muestran un perfil de sensibilidad a los antimicrobianos y los metales pesados apropiados desde la perspectiva de la salud pública, sin embargo, requiere atención a la microbiota acuática acuática en estos ambientes.

Palabras clave: Agua; Metales; Antibióticos; Resistencia bacteriana.

1. Introdução

A água é um bem limitado, essencial para existência da vida na terra e para o desenvolvimento das sociedades. Dos 3% de água doce do planeta, somente um quarto é proveniente de rios, lagos e fontes subterrâneas, sendo fundamentais para a evolução das cidades e para a qualidade de vida. No entanto, a poluição dos recursos hídricos se constitui como um dos problemas mais sérios da atualidade, já que a água é um dos importantes veículos de disseminação de enfermidades de natureza infecciosa, o que torna primordial a

avaliação de sua qualidade microbiológica (Barros et al., 2014; Hahn et al., 2015; Dias, 2016; Wagner, 2018).

Entre os micro-organismos de veiculação hídrica, destaca-se a bactéria *Escherichia coli*, espécie gram-negativa da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbia facultativa e que faz parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. Pode ainda, apresentar-se de diversas formas na natureza, incluindo cepas comensais, patogênicas de animais e humanos ou ambientais, sendo sua presença no ambiente aquático relacionada à contaminação microbiana de origem fecal. Algumas estirpes dessa bactéria podem causar doenças, pois abrigam genes de virulência, como as cepas das linhagens Difusamente Aderentes (DAEC), Enteroagregativas (EAEC), Enteroinvasivas (EIEC), Enteropatogênicas (EPEC), Enterotoxigênicas (ETEC), Produtoras de Toxina Shiga (STEC) e Enterohemorrágicas (EHEC) (Barros et al., 2014; Barros, 2017; Wagner, 2018).

Outra bactéria gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* e que pode ser propagada através da água é a *Klebsiella pneumoniae*, sendo essa, a espécie bacteriana de maior notoriedade dentro do gênero *Klebsiella*, e assim como as demais espécies desse gênero, encontra-se de maneira ubíqua na natureza, distribuída em corpos hídricos, esgoto, solo e vegetação. Também pode ser encontrada colonizando a pele, a nasofaringe e, principalmente, o trato gastrointestinal de humanos e outros animais. Ademais, por ser um micro-organismo saprófito da microbiota humana torna-se um típico patógeno oportunista, que afeta principalmente pessoas com sistema imunológico enfraquecido e tendem a causar infecções nosocomiais (Aires, 2017).

Diante disso, é importante a investigação da sensibilidade bacteriana a contaminantes presentes em concentrações traço no meio ambiente, tais como antimicrobianos e metais pesados, especialmente devido ao reconhecimento dos seus efeitos, como: toxicidade aquática, bioacumulação e biomagnificação, genotoxicidade, perturbação endócrina em animais, seleção de bactérias patogênicas resistentes, entre outros (Aquino et al., 2013).

A utilização excessiva ou inadequada de antibióticos em humanos e animais tem sido uma preocupação emergente no contexto da saúde pública, pois acelerou o aparecimento e propagação de bactérias resistentes a essas drogas, visto que, o uso indiscriminado de antibióticos aumenta a pressão seletiva e, também, a oportunidade das bactérias serem expostas aos mesmos, facilitando, dessa forma, a aquisição de mecanismos de resistência (Barros et al., 2014; Portugal, 2015).

A maioria dos antibióticos é pouco metabolizada pelos seres humanos e animais após ingestão, onde 25% a 75% são excretados na forma inalterada após o seu consumo. Como as

estações de tratamento de esgotos, geralmente não são equipadas para lidar com resíduos de antibióticos, esses são liberados no ambiente aquático e continuam a exercer uma pressão seletiva nos micro-organismos aí presentes, potenciando a resistência bacteriana, bem como toxicidade em determinados organismos (Verlicchi et al., 2012; Portugal, 2015; Balakrishna et al., 2017).

Os metais pesados amplamente utilizados na indústria, muitas vezes, chegam ao ambiente através de efluentes industriais sem um tratamento adequado para a remoção desses compostos, gerando alto grau de poluição e impacto ambiental, sendo transportados via cadeia alimentar para diversos níveis tróficos. A presença constante de metais pesados no ambiente, como poluentes faz com que micro-organismos desenvolvam mecanismos de resistência a esses compostos. Como as vias de resistência a metais e antimicrobianos muitas vezes são iguais ou semelhantes, os micro-organismos podem desenvolver resistência a um ou outro ou ambos e, normalmente, essa resistência está associada à plasmídeos (Hahn et al., 2015).

Tendo em vista que determinantes genéticos têm sido observados em organismos de ambientes naturais expostos a esses poluentes, aumenta-se a preocupação sobre os riscos que isso pode configurar para a saúde pública e ecológica. Dessa forma, o presente trabalho objetivou isolar cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* de diferentes fontes de água do Cariri Cearense, Brasil, e avaliar a sua sensibilidade a antimicrobianos e metais pesados.

2. Metodologia

O presente estudo faz uso de uma metodologia que pode ser caracterizada como uma pesquisa laboratorial e de abordagem quantitativa (Pereira et al., 2018).

2.1 Pontos Amostrais

Para realização do estudo foram coletadas amostras de água do sistema de abastecimento de uma comunidade rural no município de Missão Velha – CE, que possui como manancial de captação uma fonte subterrânea. Essas amostras foram coletadas em três diferentes pontos (Figura 1A), sendo uma amostra representativa de cada. Ainda, coletou-se uma amostra em cada um dos seguintes ambientes aquáticos do município de Juazeiro do Norte – CE (Figura 1B): Rio Salgado, Lagoa do Parque Natural Municipal das Timbaúbas e Efluente bruto do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) –

Campus Juazeiro do Norte. Assim, foi analisado um total de seis amostras no presente estudo.

Figura 1. Pontos amostrais.



*(A) Comunidade rural no município de Missão Velha – CE; (B) Juazeiro do Norte – CE. Residências – EX 01 (7°24'0.32"S, 39°9'0.44"W), EX 02 (7°24'0.31"S, 39°8'55.11"W), EX 03 (7°23'57.97"S, 39°8'44.86"W); IF 01 – Efluente bruto do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Juazeiro do Norte* (7°14'40.32"S, 39°18'24.20"W); PT 01 – Lagoa do Parque Natural Municipal das Timbaúbas (7°14'4.67"S, 39°18'30.97"W); RS 01 – Rio Salgado (7°11'43.78"S, 39°17'21.27"W).

Fonte: Elaborado no Google Earth Pro (2020).

As coletas foram realizadas em outubro de 2019 seguindo as orientações estabelecidas pelo Guia nacional de coletas e preservação de amostras (Brandão et al., 2011) e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAM) do IFCE – *Campus Juazeiro do Norte* para realização das análises necessárias ao isolamento e identificação das cepas bacterianas.

2.2 Isolamento das Cepas Bacterianas

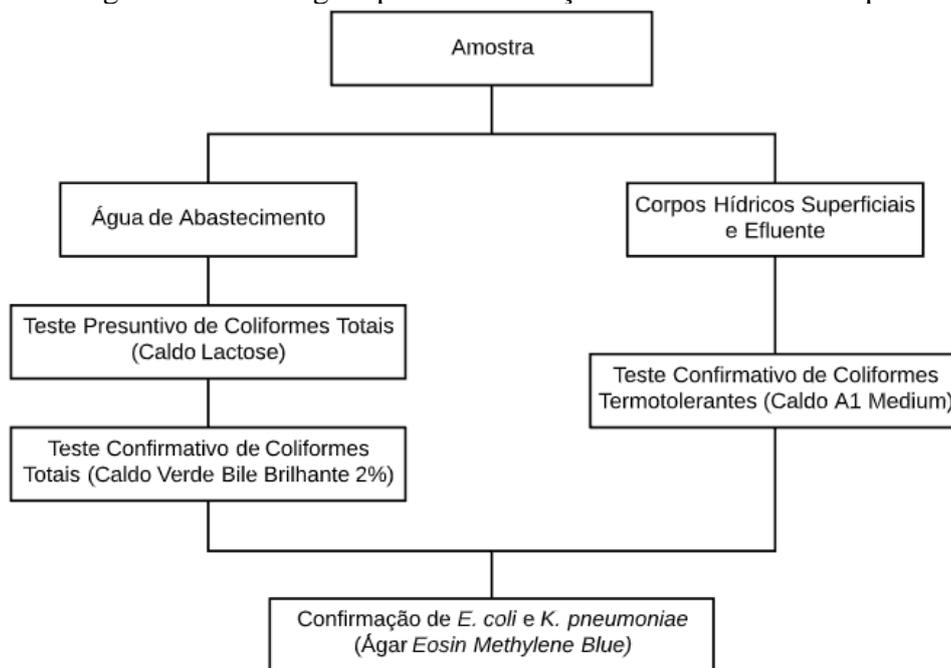
Para isolamento da *E. coli* e *K. pneumoniae* nas amostras de água de abastecimento, seguiu-se a determinação de Coliformes Totais (CT) pelo método dos Tubos múltiplos, com teste presuntivo em Caldo Lactose seguido de teste confirmativo em Caldo Verde Bile Brillante 2%. Os tubos que apresentaram crescimento de CT no Caldo Verde foram repassados para Placas de Petri com ágar *Eosin Methylene Blue* (ágar EMB) para isolamento e identificação das referidas cepas bacterianas, onde a *E. coli* apresentou um reflexo verde

metalizado e a *K. pneumoniae* produziu colônias rosadas com centro negro, de aparência brilhante, com consistência mucóide devido à produção de cápsula proeminente formada de polissacarídeos (APHA et al., 2012).

O isolamento e identificação das cepas bacterianas coletadas do Rio Salgado, Lagoa do Parque Natural Municipal das Timbaúbas e efluente bruto do IFCE - *Campus Juazeiro do Norte* foi realizado através da determinação de Coliformes Termotolerantes (CTT) pelo método dos Tubos múltiplos com teste confirmativo em Caldo A1 Medium. Os tubos que apresentaram crescimento de CTT foram repassados para Placas de Petri com ágar EMB para isolamento e identificação da *E. coli* e *K. pneumoniae* (APHA et al., 2012).

Na Figura 2, apresenta-se o fluxograma metodológico para isolamento e identificação das cepas bacterianas de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Figura 2. Fluxograma metodológico para identificação e isolamento das cepas bacterianas.



Fonte: Autores (2020).

2.3 Antibióticos

Os antibióticos usados foram imipenem (ABL Antibióticos do Brasil, São Paulo, Brasil), meropeném (Novafarma, Goiás, Brasil) e ceftriaxona (Momenta, São Paulo, Brasil), por serem antibióticos com grande utilidade no tratamento de infecções bacterianas, pois possuem um amplo espectro de atividade contra muitos organismos aeróbios e anaeróbios,

gram-positivos e gram-negativos (Kabbara et al., 2015; Anuhyta et al., 2017; Durham et al., 2017).

Todas as drogas antimicrobianas foram testadas, frente à forma bacteriana planctônica, nas concentrações de 0,25 – 128 µg/mL. Tais valores foram escolhidos por abranger concentrações extremas, dentre elas os valores delineados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2012). Os diluentes utilizados foram os determinados pela norma M100-S22 (CLSI, 2012). Assim, uma solução de 512 µg/mL foi preparada com água destilada estéril como diluente para todas as drogas utilizadas nesse estudo, sendo que essas diluições foram realizadas separadamente, de modo que cada uma apresentava-se quatro vezes mais concentrada em relação ao valor desejado para o primeiro poço (128 µg/mL), visto que a junção da solução antimicrobiana com o Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 10% resulta no decaimento de 50% da concentração inicial da droga, e a adição do inóculo bacteriano implica no declínio de 50% dessa concentração anterior (ver item 2.6).

2.4 Metais Pesados

Os metais pesados utilizados no estudo foram o cobre e o cromo nas formas de Sulfato de Cobre (CuSO₄) e Cromato de Potássio (K₂CrO₄), respectivamente, por serem reportados com frequência nos estudos realizados na Bacia do Salgado, Ceará (Leite et al., 2013; Oliveira et al., 2015; Sabiá et al., 2015; Melo et al., 2018).

Todos os metais pesados foram testados, frente à forma bacteriana planctônica, nas concentrações de 0,49 – 250 µg/mL. Tais valores foram escolhidos por abranger concentrações extremas, dentre elas as encontradas em corpos hídricos da Bacia do Salgado, Ceará (Leite et al., 2013; Sabiá et al., 2015).

Uma solução de 1000 µg/mL foi preparada com água destilada estéril como diluente para todos os metais pesados utilizados neste estudo, sendo que essas diluições foram realizadas separadamente, de modo que cada uma, assim como os antimicrobianos, apresentava-se quatro vezes mais concentrada em relação ao valor desejado para o primeiro poço (250 µg/mL).

2.5 Preparo do Inóculo Bacteriano para o Teste de Sensibilidade

Após o isolamento e identificação, as estirpes bacterianas foram cultivadas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) por 18-24 horas a 35°C. Em seguida, fragmentos das colônias

foram suspensos em solução salina estéril, a fim de atingir o padrão 0,5 da escala McFarland, equivalente a uma concentração de aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Tal suspensão foi diluída na proporção de 1:10 em caldo BHI a 10%, resultando em uma solução de 1×10^7 UFC/mL. Ao acrescentar 100 μ L desse inóculo à placa de microdiluição (ver item 2.6), obtêm-se a concentração final de 5×10^5 UFC/mL (NCCLS, 2003).

2.6 Testes de Sensibilidade

Os testes de sensibilidade foram realizados seguindo a técnica de Microdiluição em caldo delineada pela norma M7-A6, com modificações, fornecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI/NCCLS (NCCLS, 2003), sendo utilizado o Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 10%. As placas de microdiluição tiveram inicialmente seus 96 poços preenchidos com 100 μ L do caldo BHI a 10%. Feito isso, as placas destinadas aos testes de sensibilidade com os antimicrobianos receberam 100 μ L da droga nos três primeiros poços relativos à primeira coluna (triplicata) e as placas designadas para os testes com os metais pesados seguiram essa mesma orientação. Foram feitas diluições sucessivas a partir desta concentração inicial, resultando no decaimento de 50% da concentração em relação ao poço anterior. Em seguida, acrescentou-se 100 μ L do inóculo bacteriano em cada poço da placa de microdiluição, que atinge a concentração de 5×10^5 UFC/mL, além disso a concentração dos metais pesados e antimicrobianos decaiu mais 50%, resultando, assim, nos valores requeridos para análise da sensibilidade.

Utilizou-se das duas últimas colunas da placa de microdiluição como controle positivo (100 μ L de BHI a 10 % acrescido de 100 μ L do inóculo bacteriano) e negativo (100 μ L de BHI a 10% adicionado de 100 μ L da substância teste) de crescimento bacteriano. Para controle de qualidade do teste de sensibilidade preconizado pela norma M7-A6 (NCCLS, 2003), empregou-se a cepa da *American Type Culture Collection*, *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após 48 horas de incubação a 37°C adicionou-se em cada poço, 25 μ L de resazurina sódica (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha) preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01%. Decorrido um período de uma hora a temperatura ambiente, por meio

da interpretação visual do ensaio colorimétrico foi determinada a inibição bacteriana, onde a cor rosa indica crescimento microbiano e a cor azul inibição do crescimento (Caldas, 2018). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração do composto capaz de inibir 100% da atividade bacteriana.

Com intuito de legitimar os resultados, foi realizada a leitura de CIM da *Escherichia coli* ATCC 25922, onde todos os valores apresentados atenderam aos limites recomendados pelo CLSI, assegurando assim a veracidade dos resultados encontrados.

Foi utilizada a norma interpretativa do Teste de CIM para *Enterobacteriaceae* fornecida pela M100-S22 (CLSI, 2012) com intuito de verificar o grau de sensibilidade bacteriana frente aos antimicrobianos (Tabela 1). Quanto aos metais pesados, não foi possível determinar o perfil de sensibilidade bacteriana frente a esses compostos, pois não existem normas interpretativas disponíveis, sendo observados apenas os valores de CIM.

Tabela 1. Interpretação do Teste de CIM para *Enterobacteriaceae*.

Agente Antimicrobiano	Norma Interpretativa – CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	Sensível	Intermediária	Resistente
Imipenem	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem	≤ 1	2	≥ 4
Ceftriaxona	≤ 1	2	≥ 4

Fonte: Adaptado da norma M100-S22 (CLSI, 2012).

3. Resultados e Discussão

3.1 Isolamento das Cepas Bacterianas

Foram isoladas e identificadas 12 cepas bacterianas, sendo seis de *Escherichia coli* e seis de *Klebsiella pneumoniae*, uma estirpe de cada espécie em cada ponto amostral (Tabela 2).

Tabela 2. Isolados bacterianos.

Cepa	Origem	Local	Código de identificação
<i>E. coli</i>	RS	Juazeiro do Norte – CE	Ec RS 01
<i>E. coli</i>	PT	Juazeiro do Norte – CE	Ec PT 01
<i>E. coli</i>	IF	Juazeiro do Norte – CE	Ec IF 01
<i>E. coli</i>	EX 01	Missão Velha – CE	Ec EX 01
<i>E. coli</i>	EX 02	Missão Velha – CE	Ec EX 02
<i>E. coli</i>	EX 03	Missão Velha – CE	Ec EX 03
<i>K. pneumoniae</i>	RS	Juazeiro do Norte – CE	Kp RS 01
<i>K. pneumoniae</i>	PT	Juazeiro do Norte – CE	Kp PT 01
<i>K. pneumoniae</i>	IF	Juazeiro do Norte – CE	Kp IF 01
<i>K. pneumoniae</i>	EX 01	Missão Velha – CE	Kp EX 01
<i>K. pneumoniae</i>	EX 02	Missão Velha – CE	Kp EX 02
<i>K. pneumoniae</i>	EX 03	Missão Velha – CE	Kp EX 03

*RS (Rio Salgado); PT (Lagoa do Parque Natural Municipal das Timbaúbas); IF (Efluente bruto do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – *Campus* Juazeiro do Norte); EX 01 (Água de abastecimento – Ponto 01); EX 02 (Água de abastecimento – Ponto 02); EX 03 (Água de abastecimento – Ponto 03).

Fonte: Autores (2020).

Por ser uma bactéria que habita o aparelho intestinal de animais de sangue quente, a *E. coli* tem sido utilizada como indicador universal de contaminação fecal em água. Assim, observando a Tabela 2, ver-se que a água de abastecimento em todas as coletas realizadas está contaminada, uma vez que se verificou a presença de *E. coli*, estando isso relacionado a um possível tratamento ineficaz da água. Além disso, está fora dos padrões de potabilidade estabelecidos pelo Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017 (Brasil, 2017), onde se exige a ausência dessa bactéria na água destinada ao consumo humano.

A presença de *E. coli* nas amostras coletadas do Rio Salgado e Lagoa do Parque Natural Municipal das Timbaúbas pode ser justificada, principalmente, pelo lançamento de efluente, contendo material fecal nesses corpos hídricos, fato esse que também justifica a existência de *E. coli* na amostra de efluente proveniente do IFCE – *Campus* Juazeiro do Norte. Ainda, também pode ser decorrente do carreamento de dejetos animais, e até mesmo humanos, pelas águas das chuvas para esses ambientes.

A identificação de *K. pneumoniae* em todas as amostras analisadas pode ser explicada pela variedade de ambientes que essa bactéria habita, já que segundo Diniz & Santos (2019), ela pode ser encontrada na água, solo, plantas e esgoto.

3.2 Sensibilidade Bacteriana

Submetendo as cepas isoladas a testes de sensibilidade com antimicrobianos e metais pesados foram obtidas as concentrações inibitórias mínimas presentes na tabela a seguir:

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) de antimicrobianos e metais pesados frente às cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

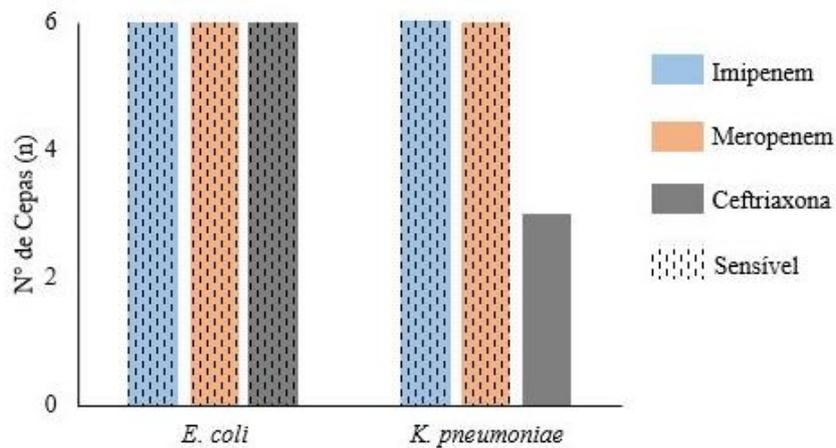
Espécie/Identificação	Antimicrobianos			Metais Pesados		
	Imipenem	Meropenem	Ceftriaxona	Cobre	Cromo	
<i>E. coli</i>	Ec RS 01	< 0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,49	< 0,49
	Ec PT 01	1,00	< 0,25	0,50	< 0,49	< 0,49
	Ec IF 01	< 0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,49	< 0,49
	Ec EX 01	1,00	< 0,25	0,50	3,91	1,95
	Ec EX 02	< 0,25	< 0,25	< 0,25	3,91	15,63
	Ec EX 03	< 0,25	< 0,25	< 0,25	3,91	3,91
<i>K. pneumoniae</i>	Kp RS 01	< 0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,49	< 0,49
	Kp PT 01	< 0,25	< 0,25	1,00	3,91	1,95
	Kp IF 01	1,00	< 0,25	0,50	15,63	31,25
	Kp EX 01	1,00	< 0,25	32,00	31,25	31,25
	Kp EX 02	1,00	< 0,25	32,00	7,81	7,81
	Kp EX 03	1,00	1,00	32,00	< 0,49	< 0,49

Fonte: Autores (2020).

Analisando a tabela anterior, percebe-se que o meropenem foi o antibiótico para o qual as bactérias, de ambas as espécies, demonstraram maior sensibilidade. As cepas de *K. pneumoniae* se apresentaram mais resistentes que as de *E. coli* para os dois metais estudados.

Comparando os resultados de CIM obtidas para os antimicrobianos (Tabela 3), com os valores interpretativos da Tabela 1, verificou-se o perfil de sensibilidade das cepas bacterianas utilizadas no presente estudo (Gráfico 1).

Gráfico 1. Perfil de sensibilidade das cepas bacterianas frente aos antimicrobianos.



Fonte: Autores (2020).

Pela análise da Tabela 3 e do gráfico anterior, ver-se que as cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* oriundas de água de abastecimento demonstraram perfil de resistência à ceftriaxona. Para o imipenem e meropenem, as cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* atestaram sensibilidade.

Resultados semelhantes foram encontrados por Martinhago et al. (2008) e por Barros et al. (2014), que analisaram cepas de *E. coli* isoladas do Lago Municipal de Cascavel no Paraná e das Praias da cidade de São Luís no Maranhão, respectivamente. Chagas (2011) analisando cepas de *K. pneumoniae* isoladas de efluente hospitalar no Rio de Janeiro verificou que 95,5% dos isolados apresentavam sensibilidade ao imipenem, assim como, Resende et al. (2009), que obteve 90% das estirpes de *K. pneumoniae* sensíveis a ação desse carbapenêmico.

As cepas, de ambas as espécies bacterianas, foram sensíveis a ação do meropenem, tendo sido esse o antimicrobiano mais efetivo contra as bactérias. Wagner (2018) também observou em sua pesquisa que todos os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* do Rio Tubarão (Santa Catarina) eram sensíveis ao meropenem, bem como, Chagas (2011), que encontrou 97,7% dos isolados de *K. pneumoniae* sensíveis a esse antimicrobiano. Chen et al. (2017), analisando a ação de antibióticos sobre cepas de *E. coli* isoladas de água de abastecimento na cidade de Hangzhou (China), constataram que todas as estirpes eram sensíveis tanto ao meropenem, quanto ao imipenem.

Os carbapenêmicos, classe da qual o imipenem e meropenem fazem parte, são antibióticos β -lactâmicos, ou seja, possuem em suas estruturas químicas o anel β -lactâmico associado a um anel de cinco membros. Esses antibióticos possuem ação ao nível da síntese do peptidoglicano, atuando através da inibição da transpeptidase, assim, o polímero linear

não é transformado em polímero cruzado e não se forma a parede celular bacteriana (Portugal, 2015; Guerreiro, 2018).

Dentre os β -lactâmicos, os carbapenêmicos são os que possuem o mais amplo espectro de atividade e maior potência contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essas características são devidas, não apenas por suas propriedades químicas que favorecem a penetração através dos canais de porinas das células bacterianas, mas também devido à sua elevada estabilidade face à degradação pelas β -lactamases e à sua forte ligação às Proteínas de Ligação à Penicilina – PBPs. Após penetrar a parede celular bacteriana através dos canais de porinas, os carbapenêmicos atravessam o espaço periplasmático e finalmente atuam através da acilação irreversível das PBPs inibindo as transpeptidases. Como a formação da parede celular é um “processo tridimensional” dinâmico, com formação e autólise ocorrendo ao mesmo tempo, quando as PBPs são inibidas, a autólise continua. Eventualmente, o peptidoglicano enfraquece e a célula explode devido à pressão osmótica (Papp-Wallace et al., 2011; Codjoe & Donkor, 2018; Guerreiro, 2018).

Verificou-se pelo Gráfico 1, que todas as cepas de *E. coli* se mostraram sensíveis para a ceftriaxona. Resultados similares foram observados por Hahn et al. (2015) em que 92,93% das cepas de *Escherichia coli* isoladas do Rio dos Sinos (Rio Grande do Sul) apresentaram sensibilidade a essa cefalosporina de 3^o geração. Resende et al. (2009), analisando a ação de antimicrobianos sobre bactérias gram-negativas isoladas de efluente hospitalar e da Estação de tratamento de esgoto da cidade de Goiânia (Goiás), também observaram que todas as cepas de *E. coli* eram sensíveis a ação da ceftriaxona.

Conforme Guerreiro (2018), as cefalosporinas de terceira geração, classe da qual a ceftriaxona faz parte, também são antibióticos β -lactâmicos. Nesses antimicrobianos, há uma substituição do anel furano presente na estrutura química das oximino-cefalosporinas pelo anel aminotiazol que melhora a penetração destas cefalosporinas através da membrana externa de bactérias gram-negativas. Isso pode aumentar a afinidade do fármaco pela transpeptidase bacteriana, dessa forma, as cefalosporinas de terceira geração possuem uma atividade acrescida sobre bactérias gram-negativas.

As cepas de *K. pneumoniae*, as oriundas de água de abastecimento, foram resistentes à ceftriaxona, enquanto as demais foram sensíveis. Prado (2007), avaliando a resistência microbiana de isolados de efluente hospitalar da cidade do Rio de Janeiro verificou que 27,9% das estirpes eram resistentes a ação dessa cefalosporina de 3^o geração, assim como Wagner (2018), verificou que 66,67% das cepas de *K. pneumoniae* isoladas do Rio Tubarão (Santa Catarina) apresentaram resistência a ceftriaxona. No entanto, Resende et al. (2009)

observaram sensibilidade em todas as cepas dessa espécie bacteriana utilizada na sua pesquisa, bem como Barcelos et al. (2016), em que todas as estirpes de *K. pneumoniae* isoladas de poços tubulares na região serrana do Espírito Santo foram sensíveis para a ceftriaxona e meropenem.

De acordo com Prado (2007), as cefalosporinas de terceira geração, foram originalmente desenvolvidas como β -lactâmicos capazes de acabar com as resistências causadas pelas β -lactamases comuns. Entretanto, em poucos anos, os bacilos gram-negativos, como *Klebsiella pneumoniae* e outras, começaram a produzir versões que se mostraram resistentes à ação dessas cefalosporinas, sendo esse aumento associado com o uso indiscriminado destes antibióticos na cura das infecções.

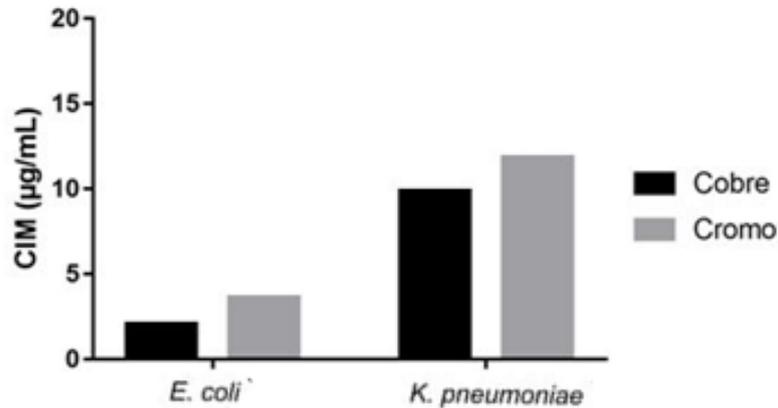
Para Moreira & Freire (2011), a *K. pneumoniae* é a espécie entre as *Enterobacteriaceae* que apresenta a maior diversidade de fenótipos de resistência associados a produção de Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL), e onde estas enzimas são mais comumente encontradas. Fontes (2012) cita que bactérias produtoras de ESBL estão frequentemente sendo isoladas não só em hospitais, mas também em outros ambientes. Ao verificar a resistência a antimicrobianos em *Enterobacteriaceae* isoladas de ambientes aquáticos no estado de São Paulo, Fontes (2012), observou que 10 cepas de *K. pneumoniae* eram produtoras de ESBL.

A resistência a ceftriaxona das três cepas de *K. pneumoniae* isoladas da água de abastecimento, pode estar relacionado a uma possível produção de ESBL, já que, essas enzimas são capazes de hidrolisar as cefalosporinas de terceira geração, sem afetar a ação dos carbapenêmicos, fato que foi observado, uma vez que essas cepas se apresentaram sensíveis ao meropenem e imipenem (Pereira, 2012; Paula et al., 2016; Diniz & Santos, 2019). Além disso, conforme Aires (2017), a cápsula produzida usualmente por isolados de *K. pneumoniae* além de representar o principal mecanismo de virulência desta espécie, possui como função neutralizar a atividade antibacteriana.

Os resultados encontrados para os antimicrobianos são satisfatórios sob a óptica da saúde pública, uma vez que as bactérias aqui estudadas, em sua grande maioria, demonstraram ser sensíveis. No entanto, do ponto de vista ecológico, essa sensibilidade observada pode sinalizar para eventuais efeitos adversos à vida e à qualidade ambiental dos ecossistemas, uma vez que esses contaminantes podem causar efeitos imediatos (toxicidade aguda) ou toxidade crônica, sobre as comunidades de bactérias, algas, peixes e zooplâncton, que desempenham um papel significativo no ambiente aquático (Bisognin et al., 2018; Felis et al., 2020).

No Gráfico 2, é possível observar a média das Concentrações Inibitórias Mínimas dos metais pesados cobre e cromo frente às cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Gráfico 2. Médias das CIMs de metais pesados para as cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*.



Fonte: Autores (2020).

Nota-se pelo Gráfico 2, que o cobre foi metal para o qual as estirpes bacterianas de *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram menor tolerância e ao comparar as duas espécies de bactérias, a *K. pneumoniae* demonstrou maior tolerância que a *E. coli* para ambos os metais utilizados no estudo.

Diante do cobre, as cepas de *E. coli* provenientes do Rio Salgado, Lagoa do Parque Natural Municipal das Timbaúbas e Efluente bruto do IFCE – Campus Juazeiro do Norte, apresentaram CIM inferiores à 0,49 µg/mL (Tabela 3), já que nessa concentração não foi observado crescimento bacteriano. Para as estirpes de *E. coli* advindas da água de abastecimento, foi observada concentração inibitória mínima de 3,91 µg/mL para esse metal pesado.

Para as cepas de *K. pneumoniae* Kp RS 01 e Kp EX 03 não foi observada atividade microbiana frente ao Cu na menor concentração testada no presente estudo (0,49 µg/mL). As demais estirpes dessa espécie bacteriana demonstraram ser mais tolerantes ao cobre, com uma cepa, a Kp EX 01, apresentando à maior CIM (31,25 µg/mL). Esses resultados de concentração inibitória mínima para o cobre, de ambas as espécies bacterianas estudadas, estão bem abaixo de alguns valores de CIM reportados para bactérias na literatura, como por exemplo, Azam et al. (2018) com 500 µg/mL; Cardonha et al. (2004) com 250 µg/mL; Hahn et al. (2015) com CIM variando entre 127,31 µg/mL e 891,17 µg/mL e, Gonçalves & Sand (2015) com variação entre 1200 µg/mL e 9600 µg/mL.

Conforme Zampieri (2015), o cobre é um metal que está associado à toxicidade aguda e crônica em bactérias, e que afeta fortemente o sistema enzimático e metabolismos celulares essenciais. Além disso, Portugal (2015) cita que o mecanismo desse metal pesado, pode estar relacionado com as suas alterações nos locais ativos de enzimas, com a mudança da integridade estrutural da membrana celular e com a degradação do DNA.

Frente ao cromo, observou-se que as estirpes de *E. coli* Ec RS 01, Ec PT 01 e Ec IF 01, bem como as *K. pneumoniae* Kp RS 01 e Kp EX 03 não apresentaram crescimento na menor concentração testada de 0,49 µg/mL. As demais cepas de *Escherichia coli* obtiveram CIM variando entre 1,95 µg/mL e 15,53 µg/mL, sendo essa a maior concentração inibitória observada para o cromo entre as cepas dessa espécie. Para a *K. Pneumoniae* notou-se que as estirpes com maiores CIM foram as Kp IF 01 e Kp EX 01, ambas com 31,25 µg/mL. Da mesma maneira que o cobre, esses resultados são inferiores aos valores de CIM para o cromo divulgados em outros estudos, como os observados por Azam et al. (2018) com 125 µg/mL e Hahn et al. (2015) com CIM variando entre 176,76 e 1060,56 µg/mL.

Segundo Zampieri (2015), o cromo é facilmente transportado através de membranas biológicas, como resultado da atividade de transportadores inespecíficos de fosfato ou sulfato, quando dentro da célula, através de várias reações químicas e por meio de diversos agentes redutores o cromo pode sofrer redução formando cromo hexavalente que é conhecido como um agente carcinogênico e mutagênico por ser capaz de formar ligações com RNA e DNA ou proteínas e induzir mutação.

Analisando a presença de metais pesados no Rio Salgado, Leite et al. (2013), observaram que as concentrações de cromo variaram entre 0,015 e 0,765 µg/mL, enquanto que o cobre esteve entre 0,605 e 1,134 µg/mL. Sabiá et al. (2015), também observaram cromo e cobre no Rio Salgado, sendo essas concentrações variando respectivamente entre 0,405 - 0,587 µg/mL e 0,595 - 0,625 µg/mL.

Alguns estudos reportam correlação entre tolerância a metais pesados e resistência a antimicrobianos, já que os genes que conferem resistência a ambos, na maioria das vezes, estão localizados no mesmo plasmídeo. Então, quando metais pesados estão presentes no ambiente, muitos micro-organismos desenvolvem mecanismos de resistência a esses poluentes. Como as vias de resistência são iguais ou semelhantes, esses micro-organismos tornam-se resistentes também aos antimicrobianos mesmo na ausência desses (Hahn et al., 2015; Kumar et al., 2019).

Para Wagner (2018), os elementos móveis, como os plasmídeos, transposons e integrons são importantes no processo de resistência, porque possuem funções de replicação

do genoma, bem como a facilidade de dispersão de genes de resistência. Os plasmídeos são bastante significativos nesse processo devido a sua capacidade e possibilidade da troca de material genético entre várias bactérias, levando a resistência até mesmo para diferentes gêneros bacterianos. Assim, quando os genes transferidos são resistentes, o micro-organismo pode codificar diferentes mecanismos bioquímicos a fim de impedir o mecanismo de ação do antimicrobiano.

Para o presente estudo observou-se que a cepa de *K. pneumoniae* Kp EX 01 que apresentou as maiores CIM para os metais pesados cobre e cromo demonstrou resistência à ceftriaxona, podendo isso está relacionado não só a uma possível produção de ESBL pela cepa, mas também com a sua maior tolerância aos metais pesados como mencionado por Hahn et al. (2015) e Kumar et al. (2019). Além disso, foi possível observar que o perfil sensível das estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* para os metais pesados, também foi verificada para os antimicrobianos analisados, sugerindo que a sensibilidade a antimicrobiano está ligada à menor tolerância ao metal pesado.

4. Considerações Finais

As cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de ambientes aquáticos do Cariri Cearense, Brasil, demonstraram ser, em sua grande maioria, sensíveis a ação dos antimicrobianos e metais pesados utilizados nesse estudo, sendo isso adequado sob a perspectiva da saúde pública, todavia, pode-se utilizar como indicativo para efeitos danosos sobre a microbiota aquática desses ambientes.

Sugere-se para futuros trabalhos a análise da capacidade dessas cepas bacterianas aqui estudadas para formar biofilme, uma vez que a formação desse agregado bacteriano contribui para a criação de um ambiente estável e protegido, que tende a auxiliar o micro-organismo a sobreviver em condições ambientais diversas, além de ser um fator determinante para a tolerância bacteriana aos antibióticos e metais pesados.

Referências

Aires, C. A. M. (2017). *Caracterização fenotípica e molecular de isolados de Klebsiella pneumoniae multirresistentes oriundos de swab retal de vigilância de hospitais de diferentes estados brasileiros* (Tese de Doutorado). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

Anuhya, T. V., et al. (2017). Meropenem Induced Hypokalemia. *Journal of clinical and diagnostic research*, 11 (8), 5-6.

APHA., et al. (2012). American Public Health Association – APHA; American Water Works Association – AWWA; Water Environment Federation – WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (22a ed.), Washington D C, 2012.

Aquino, S. F., et al. (2013). Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 18 (3), 187-204.

Azam, M., et al. (2018). Study of pandrug and heavy metal resistance among *E. coli* from anthropogenically influenced Delhi stretch of river Yamuna. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 471-480.

Balakrishna, K., et al. (2017). A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 113–120.

Barcelos, D. H. F., et al. (2016). Pesquisa de enterobactérias resistentes a antimicrobianos isoladas em poços tubulares na região serrana do Espírito Santo (Brasil). *Águas Subterrâneas*, 30 (1), 53-61.

Barros, A. L. R., et al. (2014). Resistência a metais pesados, antimicrobianos e formação de biofilme em cepas de *Escherichia coli* isoladas de praias de São Luís, Maranhão. *Revista de Patologia Tropical*, 43 (3), 277-289.

Barros, J. P. (2017). *Análise temporal do perfil de RpoS em isolados de Escherichia coli de águas residuárias* (Dissertação de Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Bisognin, R. P., et al. (2018). Revisão sobre fármacos no ambiente. *Revista DAE*, 66 (210), 78-95.

Brandão, C. J., et al. (2011). *Guia nacional de coleta e preservação de amostras*. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 326p.

Brasil. (2017). Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017 – Anexo XX. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Brasil.

Caldas, F. R. L. (2018). *Composição química e avaliação das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de polens apícolas coletados no litoral sul da Bahia* (Tese de Doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Cardonha, A. M. S., et al. (2004). Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *International Microbiology*, 7, 213-218.

Chagas, T. P. G. (2011). *Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro* (Dissertação de Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Chen, Z., et al. (2017). Prevalence of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Drinking Water Sources in Hangzhou City. *Frontiers In Microbiology*, 8 (11), 1-11.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*.

CLSI/NCCLS document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania - USA.

Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2018). Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences*, 6 (1), 2-28.

Dias, Z. M. B. (2016). *Relação entre o Uso e Ocupação do Solo e a Qualidade da Água Superficial de uma Área Rural do Distrito Federal – DF* (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade de Brasília, Planaltina, DF, Brasil.

Diniz, A. M. M., & Santos, R. M. C. (2019). *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* ESBL em Hospital Universitário, na cidade de Manaus – AM. *Rev. Epidemiol. Controle Infecç.*, 9 (2), 1-5.

Durham, S. H., et al. (2017). Appropriate Use of Ceftriaxone in the Emergency Department of a Veteran's Health Care System. *The Journal of pharmacy technology*, 33, 215-218.

Felis, E., et al. (2020). Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment - occurrence and environmental implications. *European Journal of Pharmacology*, 866, 1-15.

Fontes, L. C. (2012). *Monitoramento da resistência aos antibacterianos em membros da família Enterobacteriaceae recuperados de ambientes aquáticos no estado de São Paulo, Brasil* (Dissertação de Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Gonçalves, M. C. F., & Sand, S. T. V. D. (2015). *Identificação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias isoladas de efluente líquido proveniente do pólo petroquímico – Triunfo – RS* (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Guerreiro, L. F. (2018). *Cefalosporinas e Carbapenemos no tratamento de infecções provocadas por bactérias Gram-negativas* (Dissertação de Mestrado). Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Faro, Portugal.

Hahn, A. B. B., et al. (2015). Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em micro-organismos isolados do Rio dos Sinos, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 13 (3), 155-164.

Kabbara, W. K., et al. (2015). Evaluation of the appropriateness of imipenem/cilastatin prescription and dosing in a tertiary care hospital. *Infection and drug resistance*, 8, 31-38.

Kumar, M., et al. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International*, 124, 448-461.

Leite, M. R. M. C., et al. (2013). Estudo da concentração de metais pesados no Rio Salgado e a contribuição da indústria de folheados do cariri. *In: XXXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção*, 2013, Salvador – BA. Recuperado de <http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2013_TN_STO_185_056_22834.pdf>.

Martinhago, M. W., et al. (2008). Avaliação do Perfil de Suscetibilidade das Cepas de *Escherichia coli* Isoladas da Água do Lago Municipal de Cascavel, Paraná. *Revista Brasileira de Biociências*, 6 (1), 61-62.

Melo, E. A. O., et al. (2018). Evolução das concentrações elementares de metais e metalóides em perfil sedimentar da Bacia do Rio Salgado/CE. *In: Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia (CONTECC)*, 2018, Maceió – AL. Recuperado de <http://www.confea.org.br/sites/default/files/antigos/contecc2018/quimica/16_edcedmemepsdbdrs.pdf>.

Moreira, V. C., & Freire, D. (2011). *Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos. *In: VI Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás - Goiânia*, 2011. Recuperado de <<http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/VANESSA%20CARVALHO%20MOREIRA.pdf>>.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania - USA.

Oliveira, C. L. M., et al. (2015). Distribuição de metais traço em sedimentos superficiais de riachos urbanos de Juazeiro do Norte. *In: Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia (CONTECC)*, 2015, Fortaleza – CE. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/281649209_TRACE_METAL_DISTRIBUTION_IN_SURFACE_SEDIMENTS_OF_URBAN_MICROCATCHMENTS_OF_JUAZEIRO_DO_NORTE>.

Papp-Wallace, K. M., et al. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (11), 4943–4960.

Paula, V. G., et al. (2016). Enterobactérias produtoras de carbapenemase: prevenção da disseminação de superbactérias em UTI's. *Universitas: Ciências da Saúde*, 14 (2), 175-185.

Pereira, P. S. (2012). *Caracterização molecular de Klebsiella pneumoniae multirresistente produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas em diferentes regiões do Brasil* (Dissertação de Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Pereira, A. S., et al. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria, RS: UFSM, NTE. Recuperado de <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_MetodologiaPesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1>.

Portugal, D. S. C. G. (2015). *Prevalência de bactérias resistentes a antimicrobianos em água natural* (Dissertação de Mestrado). Universidade do Porto, Portugal.

Prado, T. (2007). *Avaliação da eficiência de um sistema de tratamento de efluente hospitalar por processo anaeróbio na remoção de coliformes, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae resistentes a antibióticos e Vírus da Hepatite A* (Dissertação de Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

Resende, A. C. B., et al. (2009). Detection of antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in hospital effluents and in the sewage treatment station of Goiânia, Brazil. *O Mundo da Saúde*, 33 (4), 385-391.

Sabiá, R. J., et al. (2015). Contaminação da bacia do Rio Salgado por influência do chorume e possível tratamento através de bioSORVENTES. *Caderno de Cultura e Ciência*, 14 (1), 174-186.

Verlicchi, P., et al. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Science of the Total Environment*, 429, 123-155.

Wagner, F. S. (2018). *Perfil antimicrobiano de cepas de Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae e Pseudomonas aeruginosa isoladas do Rio Tubarão/SC* (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, Brasil.

Zampieri, B. D. B. (2015). *Ocorrência e distribuição de bactérias resistentes a metais pesados em sedimentos da Baía do Araçá, São Sebastião (SP)* (Dissertação de Mestrado). Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Luiz Henrique Cruz Macedo – 40%

Maria Lucilene Queiroz da Silva – 25%

João Hermínio da Silva – 10%

Francisco Rodrigo de Lemos Caldas – 25%