



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA

BEATRIZ LOBATO DA SILVA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E METAIS EM BACTÉRIAS
ISOLADAS DOS RIOS PAJUÇARA E CURUAI EM SANTARÉM, PARÁ**

Belém - PA
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA

BEATRIZ LOBATO DA SILVA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E METAIS EM BACTÉRIAS
ISOLADAS DOS RIOS PAJUÇARA E CURUAI EM SANTARÉM, PARÁ**

Trabalho de conclusão de curso submetido à
Faculdade de Biotecnologia da Universidade
Federal do Pará como requisito para obtenção
do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna.

Belém - PA
2022

S586p Silva, Beatriz Lobato da.
Perfil de resistência a antibióticos e metais em bactérias
isoladas dos rios Pajuçara e Curuai em Santarém, Pará. / Beatriz
Lobato da Silva. — 2022.
40 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de
Biotecnologia, Belém, 2022.

1. Multirresistência.. 2. Gram-negativos. . 3.
Antibiograma. . 4. Metaloresistência.. I. Título.

CDD 576.15

BEATRIZ LOBATO DA SILVA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E METAIS EM BACTÉRIAS
ISOLADAS DOS RIOS PAJUÇARA E CURUAI EM SANTARÉM, PARÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna.

Data da Defesa: 25 de agosto de 2022
Conceito:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna
Faculdade de Biotecnologia - UFPA
Orientador

Prof. Dr. Rafael Ribeiro Barata
Instituto Evandro Chagas (Externo)
Membro da Banca

Prof. Dr. Agenor Valadares Santos
Faculdade de Biotecnologia - UFPA
Membro da Banca

Belém - PA
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas incontáveis bênçãos, por ter me concedido saúde, ânimo e força durante a graduação e este trabalho de conclusão de curso, e pelas pessoas maravilhosas que colocou em minha vida.

À minha família, em especial aos meus pais, Edilza Lobato e Roberto Machado, ao meu irmão Arthur Silva, meus avós maternos Laura Aguiar e Jarbas Faria (*in memoriam*), meu tio Jarbas Junior e meus avós paternos Benedita Machado e Raimundo Santos, por todo investimento, incentivo e apoio emocional em todos esse anos e por serem o meu maior pilar.

À Universidade Federal do Pará, ao Instituto de Ciências Biológicas e à Faculdade de Biotecnologia por me oferecerem um ambiente de ensino essencial para meu desenvolvimento profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Baraúna, pela dedicação, paciência e pelos ensinamentos tão importantes e valiosos. Agradeço ainda pela oportunidade e confiança em mim e no meu trabalho, que muito me estimularam.

Ao Laboratório de Engenharia Biológica e ao Centro de Genômica e Biologia de Sistemas pela infraestrutura e apoio às pesquisas realizadas, em especial aos professores: Dr. Diego Assis, Dr. Artur Silva e a Dra. Maria Paula Cruz Schneider, e às técnicas: Soraya Andrade e Silvanira Barbosa, que sempre estiveram disponíveis para ajudar.

A todos os meus colegas de laboratório, com destaque aos meus grandes amigos Davi Marcon e Ana Carolina Oliveira, por todo imensurável apoio na realização deste trabalho e por todos os momentos que dividimos na bancada e no dia a dia; e ao José Lucas dos Reis, ex-membro do laboratório, que além de me oferecer sua amizade, também fez muito por mim nessa caminhada científica.

Aos professores da graduação, em especial: Dr. Moyses Miranda, Dr. Agenor Valadares, Dra. Luciana Xavier e Dr. Rommel Ramos, pela paixão pela ciência e por todas as palavras de motivação, que tanto me inspiraram e encorajaram em cada disciplina ministrada.

Aos meus tão especiais colegas de turma e amigos de vida, Giovane Pinheiro, Gustavo Marques, Joaquim Neto, Naiana Ribeiro, Thiago Cordeiro e Valéria Silva, por toda vitória comemorada e por todo fracasso sofrido, por todas as noites sem dormir fazendo trabalho e, principalmente, por todo o amor e carinho que criamos uns pelos outros com o passar desses 4 anos.

Aos meus vizinhos e companheiros, Renata Hagmann, Isabela Lima, Eros Moreira e Ingridy Nunes, por estarem dispostos a toda hora e por todo o ombro amigo sempre. À Anna Clara Palheta, Gabriela Melo, Gabriela Monard, Gilberto Moura, Lorena Souto e Luanne Valentim, pela honra de compartilhar de momentos sempre tão leves e felizes. E, em destaque, à minha tão preciosa amiga, Nicole Vale, por toda a constância e intensidade da nossa amizade.

E por fim, aos meus amigos de ensino fundamental e médio, Ane Moura, Simily Barros, Dário Filho, Isabel Mendes, Ana Paula Hesketh, Letícia Sampaio, Hanna Sabbá e Ronney Campos por se fazerem presentes na minha vida (ainda que nem sempre de forma física) mesmo depois de tanto tempo.

RESUMO

O presente trabalho busca identificar e caracterizar o perfil de resistência a antibióticos e a metais de bactérias Gram-negativas isoladas dos rios Pajuçara e Curuai, relacionando com o impacto ambiental causado por atividades antrópicas nas proximidades desses ambientes. Para isso, as cepas isoladas dos rios tiveram seu DNA extraído e amplificado para sequenciamento do gene rRNA 16s, e foram submetidas a testes de sensibilidade à 16 antibióticos (beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e cloranfenicol) e 2 metais pesados (Arsênio e Manganês), através dos métodos disco-difusão e microdiluição em placa para concentração inibitória mínima. O gênero mais predominante entre os isolados foi *Klebsiella* (aproximadamente 45,5%), seguido de *Stenotrophomonas* (36,4%), *Achromobacter* e *Shigella* (ambos 9,1%). Cerca de 27,27% dos isolados apresentaram multirresistência, isto é, resistência a pelo menos 3 classes de antibióticos. Todos os isolados foram resistentes à amoxicilina, ampicilina e cefalotina, e sensíveis à ciprofloxacina e sulfazotrim. Os isolados dos gêneros *Stenotrophomonas* e *Achromobacter* exibiram as maiores taxas de resistência a antimicrobianos, e também obtiveram os maiores valores de concentração inibitória mínima aos dois metais testados.

Palavras-chave: Multirresistência. Gram-negativos. Antibiógramas. Metaloresistência.

ABSTRACT

The present work seeks to identify and characterize the antibiotic and metal resistance profile of Gram-negative bacteria isolated from the Pajuçara and Curuai rivers, relating it to the environmental impact caused by human activities in the vicinity of these environments. For this, the strains isolated from the rivers had their DNA extracted and amplified for sequencing the 16s rRNA gene, and were subjected to sensitivity tests to 16 antibiotics (beta-lactams, aminoglycosides, tetracyclines, sulfonamides, quinolones and chloramphenicols) and 2 heavy metals (Arsenic and Manganese), through disk diffusion and plate microdilution methods for minimum inhibitory concentration. The most predominant genus among the isolates was *Klebsiella* (approximately 45.5%), followed by *Stenotrophomonas* (36.4%), *Achromobacter* and *Shigella* (both 9.1%). About 27.27% of the isolates showed multidrug resistance, that is, resistance to at least 3 classes of antibiotics. All isolates were resistant to amoxicillin, ampicillin and cephalothin, and sensitive to ciprofloxacin and sulfazotrim. Isolates from the genera *Stenotrophomonas* and *Achromobacter* exhibited the highest rates of antimicrobial resistance, and also obtained the highest values of minimum inhibitory concentration to the two metals tested.

Keywords: Multi-resistance. Gram-negatives. Antibigram. Metalloresistance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARBs	<i>Antibiotic-Resistant Bacteria</i> , ou Bactérias Resistentes a Antibióticos, em português
ARGs	<i>Antibiotic-Resistance Genes</i> , ou Genes de Resistência a Antibióticos, em português
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CFL	Cefalotina
CIP	Ciprofloxacino
CLO	Cloranfenicol
CPM	Cefepime
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxiciclina
GEN	Gentamicina
HGT	<i>Horizontal Gene Transfer</i> ou transferência horizontal de genes, em português
IMP	Imipenem
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> , ou Concentração Inibitória Mínima
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia de Polimerase, em português
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SUT	Sulfazotrim
TOB	Tobramicina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1. Resistência a Antimicrobianos.....	15
3.1.1 Origem dos mecanismos de resistência bacteriana.....	15
3.1.1.1 Resistência natural (intrínseca e induzida).....	15
3.1.1.2 Resistência adquirida.....	15
- Mutação.....	15
- Transferência horizontal de genes.....	16
3.1.2 Disseminação de resistência bacteriana (Ambientes Aquáticos)....	16
3.2 Antimicrobianos.....	17
3.2.1 Antibióticos.....	17
3.2.1.1 Beta-lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos e Monobactams).....	17
3.2.1.2 Aminoglicosídeos.....	18
3.2.1.3 Tetraciclinas.....	18
3.2.2 Antibacterianos Sintéticos.....	18
3.2.2.1 Sulfanilamida ou Sulfametoxazol Associado à Trimetoprima	
3.2.2.2 Quinolonas.....	18
3.2.2.3 Cloranfenicol.....	19
3.3 Resistência a metais pesados.....	19
3.3.1 Arsênio e manganês.....	19
3.4 Enterobacteriaceae.....	20
3.4.1 <i>Shigella sp</i>	20
3.4.2 <i>Klebsiella sp</i>	21
3.5 Xanthomonadaceae.....	22

3.5.1 <i>Stenotrophomonas sp.</i>	22
3.6 <i>Alcaligenaceae</i> e <i>achromobacter</i>	22
3.6.1 <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Obtenção, isolamento e condições de crescimento das amostras	24
4.2 Extração de DNA	25
4.3 Amplificação e identificação através do gene rRNA 16S.....	26
4.4 Caracterização fenotípica de resistência a antimicrobianos.....	26
4.4.1 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (disco-difusão).....	26
4.4.2 Teste de concentração inibitória mínima de metais (Arsênio e Manganês).....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Predição das famílias e gêneros amostrais.....	29
5.2 Perfil fenotípico de resistência microbiana.....	31
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

Existe uma variedade de agentes antimicrobianos que são frequentemente encontrados no ambiente como: conservantes de alimentos, desinfetantes e antibióticos, usados contra microrganismos para reduzir sua capacidade de crescimento, inibir sua multiplicação ou até mesmo matá-los. A resistência antimicrobiana é definida como a capacidade dos microrganismos sobreviverem e serem viáveis sob a influência de agentes antimicrobianos (ABUSHAHEEN, M.A. *et al.* 2020).

A descoberta, comercialização e frequente administração de compostos antimicrobianos para tratar infecções revolucionaram a medicina moderna, de forma que os antibióticos se tornaram uma das intervenções médicas mais importantes em tratamentos de doenças causadas por microrganismos (MUNITA, *et al.* 2016).

Entretanto, o uso prolongado e extensivo de antibióticos causou uma aceleração da evolução genética natural das bactérias referente a resistência à antimicrobianos e, conseqüentemente, levou a uma preocupação global, especialmente relacionada às bactérias multirresistentes (popularmente chamadas de superbactérias) e aos impactos para saúde humana a curto e longo prazo (READ; WOODS, 2014). O uso abusivo de múltiplas drogas antimicrobianas também promoveu o desenvolvimento de microrganismos resistentes em ambientes além do hospitalar, atualmente sendo frequentemente identificados em ambientes comunitários (MUNITA, *et al.* 2016).

Bactérias resistentes a antimicrobianos e seus genes de resistência têm sido relatadas em diversos ambientes, incluindo solo (DJENADI *et al.*, 2018), sistemas aquáticos (OBAYIUWANA *et al.*, 2018), esgotos domésticos e hospitalares.

Humanos e outros animais que carregam microrganismos resistentes podem contaminar o ambiente, através de excretas (urina e fezes) depositadas em locais impróprios ou em sistemas de esgoto sem o devido tratamento. Em particular, as águas residuais de hospitais e instalações agrícolas intensivas são provavelmente uma fonte importante de organismos patogênicos resistentes que podem ser regularmente liberados no meio ambiente (BAQUERO, *et al.* 2008).

Na última década, vários estudos relataram que bactérias resistentes a antibióticos podem surgir no ambiente por meio de resistência cruzada a metais pesados

ou co-regulação de vias de resistência (WIREMAN *et al.*, 1997; AKINBOWALE *et al.*, 2007). O aumento da co-resistência para alguns patógenos é um problema global significativo, complicando a batalha contra doenças infecciosas. A falta de saneamento básico e o tratamento inadequado da água são fatores que contribuem para a resistência aos antibióticos e a metais, promovendo a disseminação de bactérias resistentes e a troca de material genético entre bactérias (OSIŃSKA *et al.*, 2016a).

Deste modo, o presente trabalho tem objetivo identificar bactérias e seu perfil de resistência a antimicrobianos e a metais pesados presentes nas amostras de água dos rios Pajuçara e Curuai da cidade Santarém, Pará.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar os perfis de resistência de bactérias isoladas dos rios Pajuçara e Curuai de Santarém - PA.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e cultivar linhagens bacterianas provenientes de dos rios Pajuçara e Curuai de Santarém – PA;
- Identificar espécies de isolados dos rios Pajuçara e Curuai de Santarém – PA;
- Caracterizar resistência a antimicrobianos e a metais pesados de isolados dos rios Pajuçara e Curuai de Santarém - PA;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Resistência a Antimicrobianos

3.1.1 Origem dos mecanismos de resistência bacteriana

3.1.1.1 Resistência natural (intrínseca e induzida)

A resistência intrínseca pode ser definida como uma característica que é compartilhada universalmente dentro de uma espécie bacteriana (REYGAERT, W.C.; 2018). Essa capacidade inata das bactérias de resistir aos antibióticos é conhecida como “insensibilidade”, pois os organismos não foram expostos a um determinado medicamento (ALI, J., RAFIQ, Q.A., RATCLIFFE E.; 2018) porém, o gene de resistência é invariavelmente expresso.

Os mecanismos bacterianos mais comuns envolvidos na resistência intrínseca são a permeabilidade reduzida da membrana externa (mais especificamente o lipopolissacarídeo, LPS, em bactérias Gram-negativas) e a atividade natural das bombas de efluxo (REYGAERT, W.C.; 2018).

No caso da resistência natural induzida, os genes ocorrem naturalmente nas bactérias, mas só são expressos em níveis de resistência após a exposição a um antimicrobiano.

3.1.1.2 Resistência adquirida

A resistência adquirida é definida como a resistência exibida quando uma bactéria previamente sensível adquire um mecanismo de resistência por mutação em seu próprio DNA cromossômico ou pela aquisição de novo material genético de uma fonte exógena através da transferência horizontal de genes (transformação, transposição e conjugação). A transmissão de genes de resistência mediada por plasmídeos é a via mais comum para aquisição de material genético externo (LORENZ, M. G.; WACKERNAGEL, W., 1994).

- Mutação

Desde meados do século XX, patógenos multirresistentes têm tido relevância clínica e podem ser atribuídos a mutações nas próprias bactérias (ALI, J., RAFIQ, Q.A., RATCLIFFE E.; 2018). Atualmente, com o avanço tecnológico e aprimoramento das técnicas moleculares, as mutações tornaram-se mais aparentes e fáceis de detectar.

Mutações pontuais aleatórias podem ocorrer em qualquer espécie. Mutações dentro do 23S rRNA são de particular interesse quando se trata de resistência microbiana, pois dentro

dele está o sítio de ligação mais comum para os antibióticos inibirem a transcrição e a tradução. (GAYNOR, M.; MANKIN, A., 2003)

- Transferência horizontal de genes

Para que as espécies microbianas mantenham a resistência aos antibióticos, elas devem não apenas passar genes de resistência para seus descendentes (transferência vertical), mas também ter a capacidade de disseminar genes entre outras espécies, conhecida como transferência horizontal de genes, que ocorre por meio de três mecanismos principais: transformação, transdução e conjugação.

A transformação é uma forma de recombinação genética na qual fragmentos de DNA livres de uma bactéria morta entram em uma bactéria receptora e são incorporados em seu cromossomo (CHRISTAKI, E., MARCOU, M., TOFARIDES, A., 2020). A transdução envolve a transferência de material genético entre um doador e uma bactéria receptora por meio de um bacteriófago. (TENOVER, F.C., 2006) Conjugação envolve a transferência de material genético de uma célula bacteriana para outra por contato físico direto entre as células através do qual um plasmídeo é transferido da célula doadora para a célula receptora, e é provavelmente o mecanismo mais importante de transferência horizontal de genes (CHRISTAKI, E., MARCOU, M., TOFARIDES, A., 2020).

Múltiplos genes de resistência estão frequentemente presentes em um único plasmídeo permitindo a transferência de resistência a múltiplas substâncias em um único evento de conjugação. A montagem de múltiplos genes de resistência em um único plasmídeo é mediada por elementos genéticos móveis (transposons e integrons) (TENOVER, F.C., 2006). Quando uma única bactéria possui resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos, é considerada multirresistente.

3.1.2 Disseminação de Resistência Bacteriana em Ambientes Aquáticos

Os antibióticos disseminados de forma inadequada no meio ambiente são poluentes químicos que podem acelerar o desenvolvimento de determinantes de resistência a medicamentos em bactérias, representando uma ameaça direta para a saúde humana e animal (TITILAWO *et al.*, 2015).

Bactérias resistentes são disseminadas principalmente a partir do meio urbano e fazendas de animais onde os resíduos farmacêuticos são despejados nas águas residuais e, direta ou indiretamente, atingem os ecossistemas aquáticos, incluindo sistemas de distribuição. O ambiente hospitalar é uma importante ambiente seletivo e fonte de

resíduos de antibióticos e bactérias resistentes a antibióticos que são despejados para estações de tratamento de águas residuais municipais (KORZENIEWSKA, E., KORZENIEWSKA, A., HARNISZ, M., 2013).

As águas residuais são um ambiente rico em nutrientes com temperatura ideal para o crescimento microbiano e altas concentrações microbianas, o que contribui para a ocorrência de transferência de genes entre bactérias (OSIŃSKA, A., 2017)

A capacidade das bactérias de transferir genes por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, desempenha o papel principal na disseminação da multirresistência em comunidades microbianas. Os integrons permitem que as bactérias adquiram genes, o que garante sua sobrevivência e adaptação às mudanças nas condições ambientais (DENG *et al.*, 2015).

3.2 Antimicrobianos

3.2.1 Antibióticos

O termo antibiótico, anos atrás, designava apenas substâncias naturais produzidas por bactérias ou fungos, entretanto atualmente o termo é usado popularmente para designar tanto sintéticos ou semi-sintéticos (como quinolonas), quanto compostos naturais (como a penicilina). (DÍAZ-CRUZ, M.S., 2007)

Existem diversas formas de classificar os antibióticos, como por exemplo baseado no espectro bacteriano (estreito, amplo), via de administração (oral, injetável) ou atividade (bacteriostático, bactericida). Contudo, do ponto de vista analítico, a classificação por estrutura química é a mais útil. Sob essa ótica sucedem várias classes, isto é, aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, tetraciclina, e um grupo de compostos simples.

3.2.1.1 Beta-lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos e Monobactams)

Os antibióticos β -lactâmicos são uma família de fármacos bactericidas estruturalmente relacionados contendo o anel β -lactâmico em sua estrutura química que inibem efetivamente a atividade catalítica das transpeptidases bacterianas, dessa forma tornando a parede celular da bactéria fraca e mais propícia a lise. (LIMA, L.M., 2017)

β -lactâmicos são classificados em penicilinas, cefalosporinas, carbapenênicos e monobactâmicos. Essa classificação depende da natureza química do anel fundido à unidade farmacofórica β -lactâmica. Nos antibióticos de penicilina o sistema β -lactâmico é

fundido a um anel contendo enxofre de cinco membros. Nas cefalosporinas, um anel contendo enxofre de seis membros é fundido à unidade β -lactâmica. Em carbapenemos, a unidade β -lactâmica é fundida a um anel ciclopenteno e 2,3 dihidrotiofeno, respectivamente. Nos antibióticos monobactâmicos, nenhum anel é fundido ao sistema β -lactâmico. (LIMA, L.M., 2017)

3.2.1.2 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos formam um grupo de antibióticos comumente usados em infecções bacterianas causadas por Gram-negativas aeróbicas e inibem a síntese proteica através de sua ligação na subunidade ribossômica 30s (DUARTE, S. M. da S., *et al.* 2019), induzindo a leituras incorretas e interrupção prematura da tradução do RNAm. (MARTINS *et al.*, 2019).

3.2.1.3 Tetraciclina

O mecanismo de ação desses antibióticos é através da inibição da síntese proteica bacteriana, o que ocorre principalmente através da sua ligação reversível à subunidade 30S do ribossomo bacteriano (LIMA, L.M., 2017). Desta forma, há inibição da ligação do RNA transportador a o ribossomo e, conseqüentemente, ocorre interferência no aporte e na ligação dos aminoácidos formadores das proteínas. São considerados, portanto, antibióticos bacteriostáticos.

3.2.2 Antibacterianos Sintéticos

3.2.2.1 Sulfanilamida ou Sulfametoxazol Associado à Trimetoprima

A sulfanilamida pertence ao grupo das sulfonamidas e atua na síntese de ácidos nucleicos, inibindo a síntese de ácido fólico. A sulfanilamida também possui uma seletividade tóxica para as bactérias, pois produzem seu próprio ácido fólico (GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, 2011).

O sulfametoxazol, associado à trimetoprima, compete com a síntese de ácido fólico e causa a inibição de duas vias de síntese de ácido fólico (SAUBERAN; BRADLEY, 2018).

3.2.2.2 Quinolonas

As quinolonas atuam inibindo enzimas (topoisomerasas) que são essenciais para a síntese de DNA e potencialmente para a fragmentação do DNA cromossômico. Eles têm uma atividade bactericida que depende da concentração (ALÓS, J-I., 2009) e têm sido

amplamente utilizados para o tratamento de várias infecções adquiridas na comunidade e em hospitais, na indústria de processamento de alimentos e no campo agrícola, tornando a crescente incidência de resistência às quinolonas um problema frequente associado à exposição constante a diversos microrganismos (ALVAREZ-HERNANDEZ *et al.*, 2015).

As fluoroquinolonas são classificadas com base no seu espectro de atividade e perfil farmacocinético. A ciprofloxacina é a fluoroquinolona mais potente, ativa contra uma ampla gama de bactérias, sendo as mais suscetíveis os bacilos Gram-negativos aeróbicos, especialmente as *Enterobacteriaceae* (SHARMA, P.C., *et al* 2010).

3.2.2.3 Cloranfenicol

O cloranfenicol é um antimicrobiano de espectro relativamente amplo, predominantemente bacteriostático, atuando contra Gram positivos e negativos, clamídias e micoplasmas (DEL FIOL, F. D. S., 2007).

O cloranfenicol é um antibiótico produzido pelo *Streptomyces venezuelae* e é um potente inibidor da síntese de proteínas microbianas e, em menor grau, em células eucarióticas (RUIZ & RAMIREZ, 1990).

3.3 Resistência a metais pesados

Alguns metais são oligoelementos indispensáveis à vida, pois são importantes cofatores para enzimas. As bactérias necessitam destes compostos para o seu crescimento (ARGUDÍN, M.A., 2019) no entanto, são tóxicos em altas concentrações devido à ligação a enzimas e DNA, e por produção de radicais de oxigênio (LOPEZ-MAURY *et al.*, 2002).

A introdução de metais pesados, em diversas formas no meio ambiente, pode causar modificações consideráveis na estrutura e função das comunidades microbiana. Os metais traço são contaminantes significativos em muitos sistemas aquáticos, devido em parte a fontes antropogênicas, como insumos industriais e de mineração (MATYAR, F., KAYA, A., DINÇER, S., 2008).

3.3.1 Arsênio e manganês

Dentre os metais pesados, o manganês é um contaminante muito comum de águas residuais e águas subterrâneas, pois é uma importante matéria-prima para a indústria. (JUTTUKONDA, L.J., SKAAR, E.P., 2015)

O arsênio e o manganês são metais pesados que ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos, muito comum de águas residuais, águas subterrâneas e superficiais.

Apesar de possuírem abundância relativamente baixa nesses ambientes, bactérias resistentes a esses metais são alvo de muitos estudos para serem utilizadas como agentes de biorremediação. No caso do arsênio, a alta toxicidade dos seus derivados converteu esse elemento em um dos mais bem estudados e um grave problema de saúde pública mundial (FEKIH, B., *et al.* 2018)

É aceito que praticamente todos os organismos, de bactérias a humanos, possuem mecanismos de desintoxicação de metais como esses, principalmente envolvendo sistemas de transporte capazes de os expelir das células (ROSEN E LIU, 2009).

3.4 *Enterobacteriaceae*

As *Enterobacteriaceae* são uma família de bacilos gram-negativos que formam um grande grupo bioquimicamente e geneticamente relacionado que mostra uma heterogeneidade substancial em sua ecologia, gama de hospedeiros e potencial patogênico e se encontram distribuídos em todo o mundo (BRENNER, D.J.; FARMER, J., 2015). Esses bacilos podem ser móveis ou imóveis, dependendo da espécie. São aeróbios ou anaeróbios facultativos em crescimento e têm predileção por habitar o trato gastrointestinal de animais (incluindo seres humanos) (PATERSON; L., 2012) mas também podem ser encontrados no solo, água, frutas, carnes, ovos, vegetais, grãos, plantas com flores e árvores. Sua patogenicidade para o reino animal e sua importância econômica, bem como seu rápido tempo de geração, capacidade de crescer em meios definidos e facilidade de manipulação genética os tornaram objetos de intenso estudo laboratorial (BRENNER, D.J.; FARMER, J., 2015), uma vez que existe uma tendência mundial para o desenvolvimento de multirresistência em todos os bacilos gram-negativos, incluindo as *Enterobacteriaceae*. (PATERSON; L., 2012).

3.4.1 *Shigella* sp.

Shigella são patógenos de humanos e outros primatas essencialmente, embora tenha havido relatos ocasionais de infecções em cães. A shigelose (disenteria bacilar) é transmitida oralmente através de alimentos e água contaminados ou por disseminação fecal-oral direta e é altamente infecciosa, com um inóculo mínimo de apenas 10 a 100 organismos necessários para causar a doença. As infecções causadas por algumas cepas como *S. dysenteriae* são descritas em sua maioria como multirresistentes (DEKKER, J. P., FRANK, K. M.; 2015).

Assim como outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*, *Shigella* são bacilos aeróbios e anaeróbios facultativos, tendo um metabolismo do tipo respiratório e fermentativo. São imóveis e não pigmentados e sua temperatura ótima de crescimento é de cerca de 37°C. Evidências científicas propostas por alguns autores consideram a restrição do gênero problemática devido à estreita relação genética que existe entre *Shigella* spp. e *Escherichia coli*. Não há traços únicos associados a *Shigella*. (PUPO *et al.*; 2000) Esses indícios apoiam fortemente a visão de que as espécies de *Shigella* são biótipos/patótipos ou clones de *Escherichia coli*. (STROCKBINE, N.A.; MAURELLI, A.T., 2015)

Determinados estudos publicados na década de 1950 (LURIA E BURROUS, 1957;) sugeriram que a recombinação genética entre esses organismos poderia desempenhar um papel na evolução de alguns sorotipos de *Shigella* e, mais geralmente, na evolução das populações naturais dessas bactérias.

Já na década de 1970, BRENNER *et al* (1973) publicou descobertas acerca da reassociação de DNA-DNA que forneceram os primeiros insights diretos sobre as relações evolutivas entre *Shigella* e *E. coli*. Em conclusão foi descoberto que, salvo exceções (*S. boydii* 13), as espécies de *Shigella* estavam tão relacionadas com *E. coli* (>75% de similaridade de nucleotídeos) quanto entre si. (STROCKBINE, N.A.; MAURELLI, A.T., 2015)

À semelhança de cepas de *E. coli*, os *Shigella* são quimiorganotróficos, isto é, são organismos que usam orgânicos como fonte de energia e de carbono. Eles são geralmente menos metabolicamente ativos do que típicas *E. coli*, razão pela qual crescem menos rapidamente do que a maioria dos outros membros da família *Enterobacteriaceae*.

3.4.2 *Klebsiella* sp.

Klebsiella é um gênero composto por bacilos que são dispostos isoladamente, em pares ou em cadeias curtas e muitas vezes cercado por uma cápsula. Em conformidade com a definição geral da família *Enterobacteriaceae*, são imóveis (exceto *K. mobilis*) e facultativamente anaeróbicos. As cepas deste gênero são encontrados em águas superficiais, esgoto, solo e em plantas. Eles também colonizam as superfícies mucosas de humanos, cavalos e suínos. (GRIMONT, P.A.; GRIMONT, F., 2015)

Klebsiella são patógenos oportunistas que são frequentemente isolados de várias infecções em animais e humanos. Em humanos, *Klebsiella* spp. causa infecções principalmente em pacientes hospitalizados (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Em

animais, infecções do trato urinário, trato respiratório e sepse são as manifestações clínicas mais comuns (BRISSE, S.; DUIJKEREN, E.V, 2005)

3.5 *Xanthomonadaceae*

A família *Xanthomonadaceae* é amplamente difundida de bactérias Gram-negativas pertencentes à subdivisão gama das proteobactérias e composta por bactérias filogeneticamente relacionadas de diversas origens e significados, incluindo os gêneros fitopatogênicos *Xylella*, e *Xanthomonas* e o gênero relacionado *Stenotrophomonas*. (TIMILSINA, S.; POTNIS, N.; NEWBERRY, E.A., *et al.* 2020)

3.5.1 *Stenotrophomonas sp.*

Esse gênero compõe-se de bacilos retos ou curvos mas não helicoidais, que ocorrem sozinhos ou em pares; móveis por dois ou mais flagelos polares; aeróbicos, tendo um metabolismo do tipo estritamente respiratório com oxigênio como aceptor de elétrons (PALLERONI, N.J., 2015).

Embora as *Stenotrophomonas spp.* ocorram de forma ubíqua no meio ambiente, o solo e as plantas são seus principais reservatórios ambientais. Membros do gênero *Stenotrophomonas* têm um importante papel ecológico nos ciclos de nitrogênio e enxofre e várias espécies de *Stenotrophomonas*, especialmente *S. maltophilia* e *S. rhizophila*, podem se envolver em interações benéficas com plantas. *S. maltophilia* também é um patógeno humano emergente que é responsável por infecções fatais em humanos (RYAN, R.P., *et al* 2009).

A alta frequência de detecção de *S. maltophilia* como patógeno oportunista e isolamento de materiais de origem clínica, tem motivado inúmeros estudos sobre a suscetibilidade das cepas a diversos antibióticos, bem como as condições intrínsecas e exógenas que afetam tal sensibilidade (BROOKE, JS. 2012).

3.6 *Alcaligenaceae e achromobacter*

O gênero *Achromobacter* foi estabelecido pela primeira vez em 1923 pelo Comitê da Sociedade de Bacteriologistas Americanos na época, hoje denominada Sociedade Americana de Microbiologia. A estreita semelhança do gênero *Achromobacter* com o gênero *Alcaligenes*, ambos membros da família *Alcaligenaceae* da ordem *Burkholderiales*, levou à reatribuição de várias espécies de *Achromobacter* ao gênero *Alcaligenes* e vice-versa. Esse gênero compreende atualmente 19 espécies oficialmente designadas, a maioria das quais foi caracterizada na última década (ISLER, B., *et al.*, 2020)

De modo geral são bacilos móveis com 1–20 flagelos que se projetam em todas as direções, não formam esporos e são obrigatoriamente aeróbico e não fermentativo. (BUSSE, H.J.; AULING, G., 2015)

3.6.1 *Achromobacter xylosoxidans*

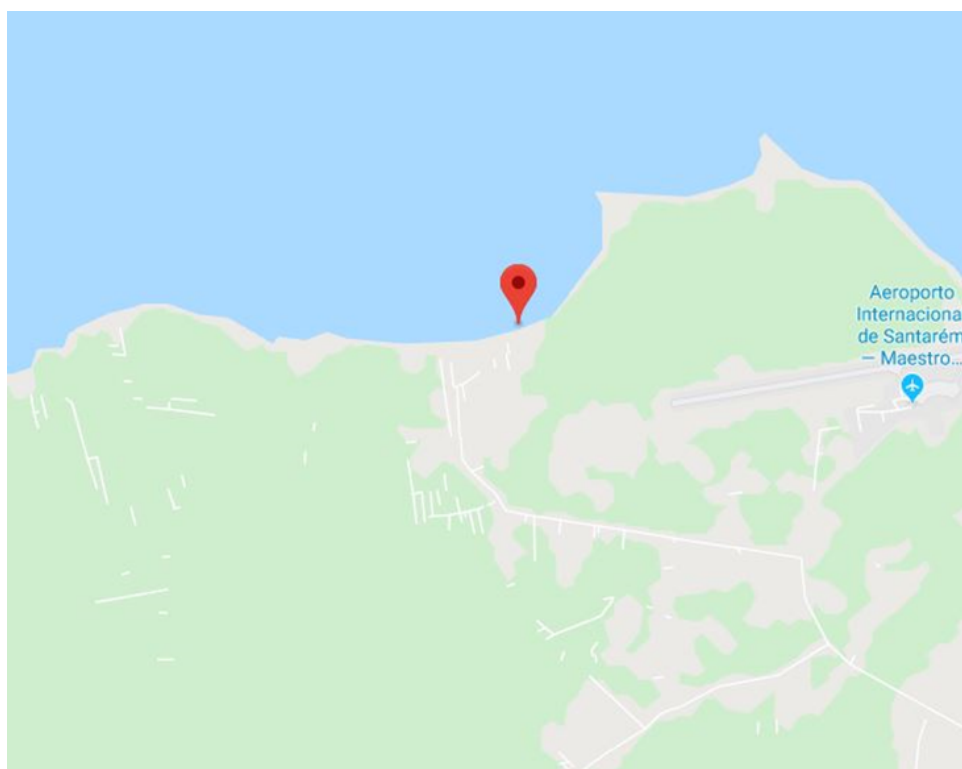
Em todo o mundo, *A. xylosoxidans* é a espécie mais comum recuperada de amostras clínicas. As infecções por *A. xylosoxidans* incluíram bacteremia, meningite, infecções do trato urinário, abscessos, osteomielite, úlceras de córnea, endocardite de prótese valvar, peritonite, fibrose cística e pneumonia em hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos (DUGGAN, J. M., *et al* 1996).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção, isolamento e condição de crescimento das amostras

A amostragem de água foi realizada no Município de Santarém, localizado na região noroeste do estado do Pará, na Praia de Pajuçara (coordenadas 2°25'07.5"S 54°48'55.7"W) e Curuai (coordenadas 2°16'26.9"S 55°28'18.6"W). Foram utilizadas garrafas estéreis de boca larga e com capacidade aproximada 500 ml, onde foram coletadas amostras de água de regiões fóticas em um volume de aproximadamente 2 litros de água em cada um dos diferentes pontos da localidade (Figuras 1 e 2):

Figura 1. Mapa da região da Praia de Pajuçara, Santarém-PA.



Fonte: Google Maps, acesso em abril de 2022.

Figura 2. Mapa da região de Curuai, Santarém-PA.



Fonte: Google Maps, acesso em abril de 2022.

Após a coleta, as amostras foram então acondicionadas e levadas ao laboratório de Genômica e Biologia de Sistemas da Universidade Federal do Pará em até 48h.

Para a obtenção dos isolados foi empregada a técnica de filtração, onde as amostras de água obtidas foram filtradas em membranas com poro de 0,22 μm em diferentes volumes (1, 2, 10 e 100 ml). Posteriormente, as membranas foram depositadas em placas de 60 mm contendo meio de cultura MacConkey Ágar (seletivo para bactérias gram negativas) suplementado com cefotaxima (8 $\mu\text{g/ml}$). As placas semeadas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

4.2 Extração de DNA

Para extração de DNA, os isolados bacterianos foram inoculados em meio Tryptic Soy Broth (KASVI) e cultivados a 37°C durante a noite com agitação. Uma alíquota de 5 ml da cultura foi centrifugada a 13.000 RPM por 10 min. O pellet celular foi submetido à extração de DNA usando o método de fenol clorofórmio. A qualidade do DNA extraído foi determinada pelo padrão da banda em gel de agarose 1,5%.

4.3 Amplificação e identificação através do gene rRNA 16S

O gene RNA ribossomal 16s foi amplificado usando os iniciadores universais específicos 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e 1492R (5'- GT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). A PCR foi realizada em uma reação de 25 µL [12,5 ul de GoTaq Master Mixes (PROMEGA), 1 ul de cada primer (0,2 pmol), 1 ul de amostra de DNA (entre 20 e 100 ng) e 9,5 ul de água ultrapura (Milli-Q)]. As condições de ciclagem foram uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 95 ° C por 1 min, 55°C por 1 min e 72 C por 1 min, e uma etapa de extensão final de 72°C por 10 min.

O sequenciamento foi realizado na plataforma Sanger ABI 3.500 (Thermo Fisher Scientific). As leituras foram tratadas e exportadas utilizando o software do fabricante. Para identificação das espécies das amostras, foi realizado alinhamento de sequências utilizando a ferramenta web BLASTN (NCBI) com os parâmetros default e o banco de dados de RNA Ribossomal, considerando a espécie do microrganismo a espécie com o alinhamento de maior identidade e e-value.

4.4 Caracterização fenotípica de resistência a antimicrobianos e metais pesados

4.4.1 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (disco-difusão)

Para estimar o perfil de resistência dos isolados foi aplicada a técnica de disco-difusão (Método de Kirby e Bauer) (Bauer *et al.*, 1966) seguindo as recomendações descritas pela Laborclin (Rev.: 05, 04/2011). Cada isolado foi diluído em solução salina até o valor de 0,5 da escala de MacFarland. A diluição foi aplicada com auxílio de um swab sobre toda a superfície do meio ágar Mueller-Hinton em placas petri de 60 mm. Após isto, foi aplicado sob a superfície, espaçadamente, discos impregnados com variados antibióticos (Laborclin, Brasil) (Tabela 1). Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão *Escherichia Coli* ATCC 25922.

Tabela 1: Antibióticos testados e suas respectivas quantidades em µg.

	Antibióticos β-lactâmicos								Antibióticos de outras classes							
	AMO	AMC	AMP	CFL	CPM	IMP	ATM	CAZ	CTX	CIP	CLO	GEN	TOB	DOX	AMI	SUT
Quantidade (µg)	20/10	30	10	30	30	10	30	30	30	5	30	10	10	30	30	25

Tabela 1 - Antibióticos: amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, cefalotina, cefepime, imipenem, aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ciprofloxacino, cloranfenicol, gentamicina, tobramicina, doxiciclina, amicacina e sulfazotrim, respectivamente.

As placas inoculadas foram incubadas durante 16 a 24 horas a 37°C e a medida dos halos de inibição foi realizada utilizando-se régua para medição de antibiograma. Os valores do halo de inibição foram comparados com os valores padrões segundo a norma do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI.

4.4.2 Teste de concentração inibitória mínima de metais (Arsênio e Manganês)

- Preparo do inóculo

Cada isolado e a cepa padrão *Escherichia Coli* ATCC 25922 foram cultivados em ágar Mueller-Hinton a 37°C por 16 – 18 horas (overnight), depois foram selecionadas colônias iguais da placa para suspender em solução salina estéril (NaCl 0,9%) à uma turvação de 0,5 na escala MacFarland.

- Microdiluição em caldo

Em uma placa de 96 poços com fundo cônico, foi adicionado 100 µL do caldo Mueller-Hinton 2X estéril em todos os poços. Na primeira e na oitava coluna (H e A) da placa em posição vertical foi adicionado 100 µL de água MilliQ estéril (a mesma usada para preparar as soluções-trabalho de cada metal testado). Nas colunas de 2 a 6 (G, F, E, D, C, B) foram adicionados 100 µL das soluções de metal (nas respectivas concentrações em molar: 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625 e 0.0031) totalizando 200 µL de volume final que em seguida foi homogeneizado e descartado 100 µL, de tal modo que o volume final de cada poço antes dos inóculos fosse de 100 µL.

Quanto aos inóculos, foram aplicados 5 µL em todos os poços de cada linha de acordo com o isolado, exceto na coluna H que corresponde ao controle negativo. A linha 1 em todas as placas correspondeu a cepa padrão *Escherichia Coli* 25922 como controle de sensibilidade e as linhas de 2 a 12 correspondem a cada isolado testado. Os testes foram feitos em triplicata, de forma que para cada teste de metal foram preparadas três placas de 96 poços. As placas foram seladas com adesivo estéril e incubadas a 35°C por 16 a 20 horas sob agitação de 150 RPM.

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) é a menor concentração da solução de metal que inibe completamente o crescimento do organismo nos poços de microdiluição conforme detectado a olho nu ao comparar com a turbidez do controle positivo (coluna A). Nos casos de difícil visualização a olho nu, foi aplicada a solução de corante

comercial à base de resazurina, alamarBlue (invitrogen), que a partir da resposta à atividade metabólica das células vivas, converte a resazurina em resorufina fluorescente de cor rosa.

Para os isolados que não houve inibição no crescimento na maior concentração testada (0,1 M) de um determinado metal, foi feita uma nova triplicata com diluições em concentrações mais altas a fim de encontrar o valor de concentração inibitória mínima.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Predição das famílias e gêneros amostrais

Após o repique das colônias isoladas, foram obtidos cerca de 65 isolados, que foram armazenados em glicerol 30% a -80°C. Dos 65 isolados, somente 11 isolados (quatro isolados do rio Curuai e sete isolados do rio Pajuçara) foram mantidos viáveis e utilizados no presente estudo, após sucessivos problemas elétricos e de acondicionamento a -80°C durante o período da pandemia de COVID-19.

A tabela 2 demonstra a identificação taxonômica de acordo com o alinhamento das sequências utilizando o BLASTN. Nela é possível observar que todos os isolados possuíram identidade maior que 99% com seus respectivos resultados, entretanto apenas para a cepa PAJ 12B foi possível identificar espécie.

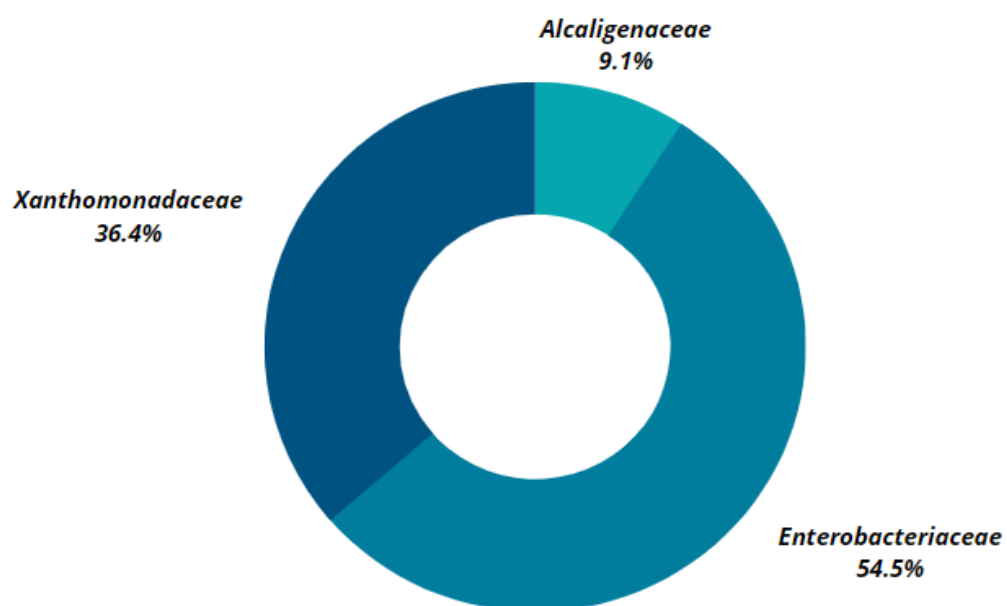
Tabela 2: Resultado do BLASTN.

Amostras	Taxonomia	Identity (%)	e-value
CRR 01	<i>Klebsiella sp.</i>	99.854	0.0
CRR 02	<i>Klebsiella sp.</i>	99.856	0.0
CRR 03	<i>Klebsiella sp.</i>	99.863	0.0
CRR 04	<i>Klebsiella sp.</i>	99.846	0.0
PAJ 11A	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	100.000	0.0
PAJ 11B	<i>Klebsiella sp.</i>	99.750	0.0
PAJ 12	<i>Shigella sp.</i>	99.657	0.0
PAJ 12B	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	100.000	0.0
PAJ 13A	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	100.000	0.0
PAJ 15B	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	99.555	0.0
PAJ 16	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	99.626	0.0

Fonte: autor.

Quantitativamente, estes isolados foram associados principalmente à família *Enterobacteriaceae* (54,5%), seguida pela família *Xanthomonadaceae* (36,4%) e a família *Alcaligenaceae* (9,1%) (Figura 3).

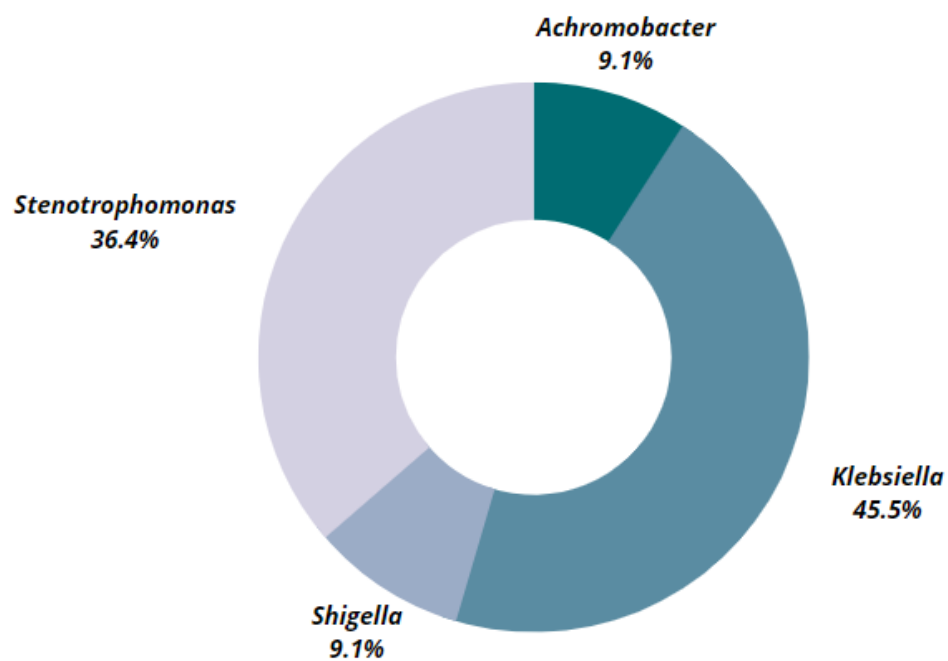
Figura 3: Famílias predominantes.



Fonte: autor.

Quanto aos gêneros mais predominantes, a maior quantidade de isolados são *Klebsiella* (5 isolados), seguido por *Stenotrophomonas* (4 isolados) e *Shigella* e *Achromobacter* com 1 isolado cada (Figura 4).

Figura 4: Gêneros predominantes.



Fonte: autor.

5.2 Perfil fenotípico de resistência microbiana

- Antibióticos

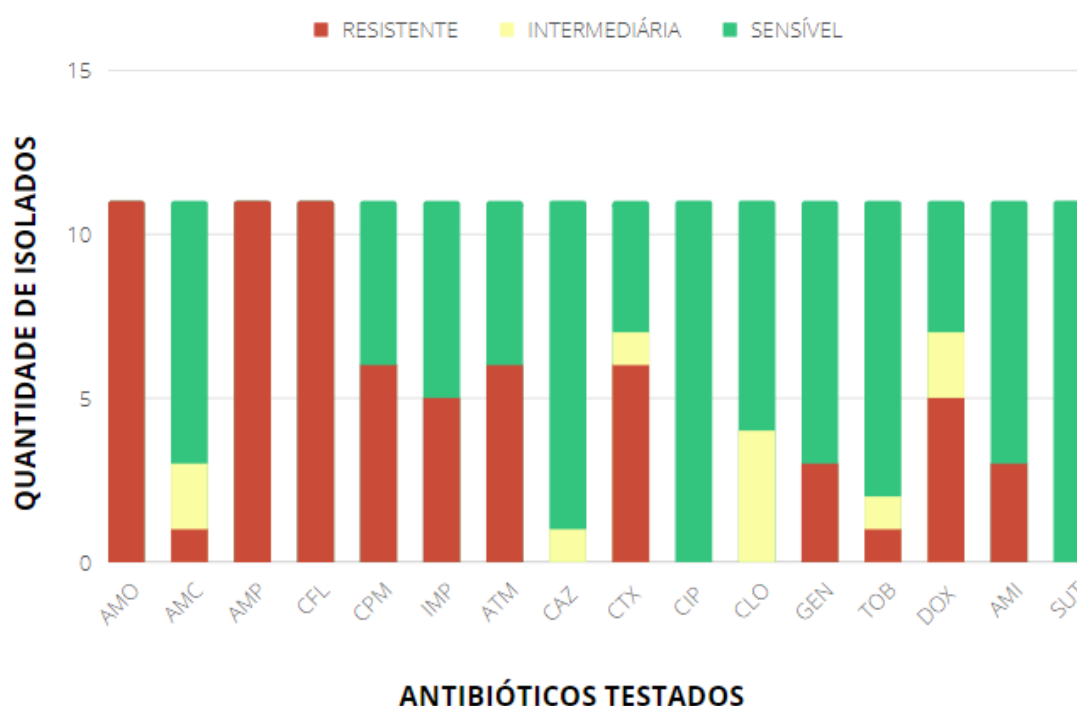
Cerca de 27,27% dos isolados foram classificados como multirresistentes. Todos os isolados apresentaram resistência aos antibióticos amoxicilina e ampicilina (penicilinas) e ao antibiótico cefalotina (cefalosporinas de 1ª geração). Esses resultados assemelham-se com estudos anteriores, que relataram a presença de bactérias multirresistentes em sistemas aquáticos naturais que podem ser resultado das diversas pressões antrópicas (TAYLOR *et al.*, 2011). Entretanto, combinando amoxicilina com um inibidor de beta-lactamase (ácido clavulânico) somente 9,1% dos isolados é considerado resistente e 18,18% possuem resistência intermediária, de acordo com os valores padrões fornecidos pela CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*).

Mais da metade, 6 de 11 isolados (54,5%), foram classificados como resistentes a cefotaxima e 1 (9,1%) apresentou resistência intermediária. Esse era um resultado previsível, uma vez que essa foi a droga utilizada no isolamento para seleção dos isolados. Entretanto, a quantidade utilizada para seleção foi de 8µg e do disco utilizado no teste de antibiograma foi de 30µg, logo ainda que mais da metade fosse considerada resistente, 5 amostras foram consideradas sensíveis (todas cepas de *Klebsiella*).

Apenas 1 isolado apresentou resistência a ceftazidima, ainda que considerada intermediária. Resistência a carbapenem foi detectada apenas em *Stenotrophomonas* e *Achromobacter* (45,5% dos isolados).

Para antibióticos não-betalactâmicos, os níveis de resistência foram observados contra 24,2% dos aminoglicosídeos GEN, TOB e AMI (3% resistência intermediária). Todos os isolados foram considerados sensíveis a classe Quinolonas (CIP) e sulfonamidas (SUT). Aproximadamente 36,4% dos isolados apresentaram resistência intermediária a Cloranfenicol (CLO) e o restante foi considerado sensível. Com relação às tetraciclinas, 45,5% dos isolados são avaliados como resistentes, 18,2% possuem resistência intermediária e 36,3% são apontados como sensíveis.

Figura 5: Quantidade de isolados resistentes, intermediários e sensíveis para cada antibiótico testado.



Fonte: autor.

Fig. 5 - Antibióticos: amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, cefalotina, cefepime, imipenem, aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ciprofloxacino, cloranfenicol, gentamicina, tobramicina, doxiciclina, amicacina e sulfazotrim, respectivamente.

Como destaque, os isolados dos gêneros *Stenotrophomonas*, *Shigella* e *Achromobacter* (54,6%) apresentaram as maiores taxas de resistência a múltiplos antimicrobianos (Tabela 3). As cepas *Stenotrophomonas* PAJ 11A apresentou resistência a 62,5% antibióticos testados, *Shigella* PAJ 12 com resistência a 50% dos antimicrobianos e 12,5% de resistência intermediária e *Achromobacter* PAJ 12B na qual se verificou 56,25% de resistência e 6,25% de resistência intermediária.

Tabela 3: Isolados com maior potencial de resistência e valores dos halos do antibiograma para cada antibiótico.

Amostras	Antibióticos β-lactâmicos								Antibióticos de outras classes							
	AMO	AMC	AMP	CFL	CPM	IMP	ATM	CAZ	CTX	CIP	CLO	GEN	TOB	DOX	AMI	SUT
<i>Stenotrophomonas</i> PAJ 11A	0	18	0	0	0	0	0	26	0	26	25	0	0	22	5	24
<i>Shigella</i> PAJ 12	0	20	0	0	10	26	0	20	0	30	23	0	14	14	16	20
<i>Achromobacter</i> PAJ 12B	0	22	0	0	10	5	0	20	0	30	27	8	18	13	14	24

■ RESISTENTE ■ INTERMEDIÁRIA ■ SENSÍVEL

Fonte: autor.

Tabela 3 - Antibióticos: amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, cefalotina, cefepime, imipenem, aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ciprofloxacino, cloranfenicol, gentamicina, tobramicina, doxiciclina, amicacina e sulfazotrim, respectivamente.

- Metais

Comparadas a cepa padrão utilizada (*Escherichia Coli* ATCC 25922), todas as amostras tiveram um valor de concentração inibitória mínima maior. Para os isolados que não houve inibição no crescimento na maior concentração testada (0,1 M) de um determinado metal, foi feita uma nova triplicata com diluições em concentrações mais altas a fim de encontrar o valor de concentração inibitória mínima.

Os isolados dos gêneros *Stenotrophomonas* (Amostras PAJ 11A, 13A, 15B e 16), *Shigella* (PAJ 12) e *Achromobacter* (PAJ 12B) obtiveram valores maiores em comparação aos isolados do gênero *Klebsiella* (Amostras CRR 01, 02, 03, 04 e PAJ 11B) (Tabela 4).

Tabela 4 – Teste Concentração Inibitória Mínima (CIM) com concentrações entre 0,0031M a 0,1M

TESTE 1 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (0,1M a 0,0031M)		
AMOSTRAS	ARSÊNIO	MANGANÊS
<i>E.Coli</i> (controle)	>0,0031 M	>0,00625 M
CRR 01	>0,00625 M	>0,0125 M
CRR 02	>0,00625 M	>0,0125 M
CRR 03	>0,00625 M	>0,0125 M
CRR 04	>0,00625 M	>0,0125 M
PAJ 11A	>0,05 M	-
PAJ 11B	>0,00625 M	>0,0125 M
PAJ 12	-	>0,05 M
PAJ 12B	-	>0,05 M
PAJ 13A	>0,05 M	>0,0125 M
PAJ 15B	>0,05 M	>0,05 M
PAJ 16	>0,025M	>0,05 M

Fonte: autor.

No segundo teste de concentração inibitória mínima, as concentrações de arsênio variaram entre 0,05 M a 1,6 M, enquanto que para o manganês, a concentração variou entre 0,1M a 3,2M.

Para o arsênio, os maiores valores de concentração inibitória mínima são dos isolados PAJ 12 e PAJ 12B, *Shigella* e *Achromobacter* respectivamente (Tabela 5); o valor da MIC foi de 0,8 M para ambos. Para o manganês, a amostra com o maior valor de concentração inibitória mínima foi a PAJ 11A (*Stenotrophomonas*), que exibiu inibição de crescimento na concentração de 0.4M.

Tabela 5 – Teste Concentração Inibitória Mínima (CIM) com concentrações entre 0,05M a 1,6M para arsênio.

TESTE 2 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	
Amostras	ARSÊNIO (1,6M a 0,05M)
PAJ 12	>0,4M
PAJ 12B	>0,4M
Amostras	MANGANÊS (3,2M a 0,1M)
PAJ 11A	>0,2M

Fonte: autor.

Novamente, as cepas dos gêneros *Stenotrophomonas*, *Shigella* e *Achromobacter* exibiram os mais altos níveis de resistência, dessa vez aos metais pesados testados (PAJ 11A – maior concentração inibitória mínima do Arsênio e PAJs 12 e 12B maiores concentrações inibitórias mínimas relacionadas ao Manganês), reforçando a hipótese de co-resistência / resistência cruzada proposta por outros estudos citados anteriormente.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, é possível observar, além da predominância de bactérias co-resistentes e um valor elevado de bactérias multirresistentes a antibióticos (pouco menos de 28%), a importância do monitoramento da disseminação da resistência em ambientes aquáticos. Os rios Pajuçara e Curuai estão localizados próximo a área urbana de Santarém-PA e as atividades antrópicas adjacentes podem ser um dos fatores de impacto ambiental nas comunidades microbianas nativas, acelerando a disseminação de genes de resistência e possivelmente induzindo risco à saúde humana.

Por fim, como perspectiva, todos os isolados serão objetos de estudo em novos projetos que irão verificar presença de genes de beta-lactamases e sequenciar o genoma dos isolados considerados de maior impacto e interesse biotecnológico para posterior análise molecular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSHAHEEN, M.A., MUZAHEED, FATANI A.J., ALOSAIMI, M., MANSY, W., GEORGE, M., ACHARYA, S., RATHOD, S., DIVAKAR, D.D., JHUGROO, C., VELLAPPALLY, S., KHAN, A.A., SHAIK, J., JHUGROO, P.; Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Dis Mon.* 2020 Jun;66(6):100971. doi: 10.1016/j.disamonth.2020.100971.

AKINBOWALE, O. L. *et al.* Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, n. 2, p. 177–182, ago. 2007.

ALI J., RAFIQ Q.A., RATCLIFFE E. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Future Sci OA.* 2018 Feb 5;4(4):FSO290. doi: 10.4155/fsoa-2017-0109. PMID: 29682325; PMCID: PMC5905577.

ALÓS, J.-I. Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 27, n. 5, p. 290–297, 1 maio 2009.

ALVAREZ-HERNANDEZ, D.A.; GARZA-MAYEN, G.S.; VAZQUEZ-LOPEZ, R. Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev. chil. infectol.*, Santiago, v. 32, n. 5, p. 499-504, oct. 2015. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000600002>.

ARGUDÍN, M.A., HOEFER, A., BUTAYE, P. Heavy metal resistance in bacteria from animals. *Res Vet Sci.* 2019 Feb;122:132-147. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.11.007. Epub 2018 Nov 20. PMID: 30502728.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.-L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, n. 3, p. 260–265, jun. 2008.

BEN FEKIH, I. *et al.* Distribution of Arsenic Resistance Genes in Prokaryotes. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 23 out. 2018.

BRENNER, D. J. *et al.* Polynucleotide Sequence Relatedness Among *Shigella* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 1973.

BRENNER, D.J. AND FARMER, J., III (2015). *Enterobacteriaceae*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00222>

BRISSE, S., DUIJKEREN, EV. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Vet Microbiol.* 2005 Feb 25;105(3-4):307-12. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.11.010. Epub 2005 Jan 22. PMID: 15708829.

BROOKE, J.S.; *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Jan;25(1):2-41. doi: 10.1128/CMR.00019-11. PMID: 22232370; PMCID: PMC3255966)

BUSSE, H.-J. AND AULING, G. (2015). *Achromobacter*. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds M.E. Trujillo, S. Dedys, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00926>

CHRISTAKI, E., MARCOU, M., TOFARIDES, A.; Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol.* 2020 Jan;88(1):26-40. doi: 10.1007/s00239-019-09914-3. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31659373.

DE FARIA, R. S. A.; PERECMANIS, S.; NOVAIS, E. de P. F.; RODRIGUES, M. M.; DE OLIVEIRA, C. N. M.; LETTIERI, T. C.; COSTA, T. M.; RAMOS, F. R. Perfil de resistência à antimicrobianos da classe dos Beta-lactâmicos e Aminoglicosídeos em cepas de *Escherichia coli* isoladas entre janeiro de 2015 e dezembro de 2018 / Antimicrobial resistance profile of the Beta-lactams and Aminoglycosides class in *Escherichia coli* strains isolated between january 2015 and december 2018. *Brazilian Journal of Development, [S. l.]*, v. 8, n. 7, p. 51673–51691, 2022. DOI: 10.34117/bjdv8n7-198.

DEKKER, J. P., & FRANK, K. M. (2015). *Salmonella, Shigella, and Yersinia*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 225–246. doi:10.1016/j.cll.2015.02.002

Isler B, Kidd TJ, Stewart AG, Harris P, Paterson DL. *Achromobacter* Infections and Treatment Options. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Oct 20;64(11):e01025-20. doi: 10.1128/AAC.01025-20. PMID: 32816734; PMCID: PMC7577122.

DEL FIOLE, F. D. S. USO DE CLORANFENICOL NA GESTAÇÃO. *Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia*, v. 2, n. 1, 2007. DOI: 10.5216/ref.v2i1.1945. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/view/1945>.

DENG, Y., BAO, X., JI, L. *et al.* Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14, 45 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>

DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Chapter 2.1 Analysis of antibiotics in aqueous samples. *Analysis, Fate and Removal of Pharmaceuticals in the Water Cycle*, p. 61–93, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(07\)50002-4](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(07)50002-4).

DJENADI, K. *et al.* Carbapenem resistance in bacteria isolated from soil and water environments in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 15, p. 262–267, dez. 2018.

DUARTE, S. M. da S.; FARIA, F. V.; LIMA, R. M. de S.; SAMPAIO, J. S.; MAIA, T. M. B.; GUIMARAES, G. R.; MARTINS, M. de O.; DEPRA, L. B. B.; FONSECA, L. da S. Revisão Sistemática da Resistência e Farmacodinâmica de Antibióticos/ Systematic Review of Resistance and Pharmacodynamics of Antibiotics. *Brazilian Journal of Development, [S. l.]*, v. 5, n. 10, p. 21476–21489, 2019. DOI: 10.34117/bjdv5n10-301.

DUGGAN, J. M., GOLDSTEIN, S. J., CHENOWETH, C. E., KAUFFMAN, C. A., & BRADLEY, S. F. (1996). *Achromobacter xylosoxidans* Bacteremia: Report of Four Cases and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*, 23(3), 569–576. doi:10.1093/clinids/23.3.569)

GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro river basin Removal in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. *Environment International*, v. 37, n. 2, p. 462–473, fev. 2011.

GAYNOR, M., & MANKIN, A. (2003). *Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(9), 949–960. doi:10.2174/1568026033452159

GRIMONT, P.A. AND GRIMONT, F. (2015). *Klebsiella*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01150>

JUTTUKONDA, L.J. AND SKAAR, E.P. (2015), Manganese utilization and bacterial virulence. *Molecular Microbiology*, 97: 216-228. <https://doi.org/10.1111/mmi.13034>

KORZENIEWSKA, E.; KORZENIEWSKA, A.; HARNISZ, M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 91, p. 96–102, maio 2013.

LIMA, C.C.; Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. *CuidArte, Enferm* ; 11(1): 105-113, jan.2017.

LÓPEZ-MAURY, L., GARCÍA-DOMÍNGUEZ, M., FLORENCIO, F.J. AND REYES, J.C. (2002), A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology*, 43: 247-256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02741.x>

LORENZ, M. G.; WACKERNAGEL, W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*, v. 58, n. 3, p. 563–602, 1994.

LURIA, S. E.; BURROUS, J. W. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *Journal of Bacteriology*, v. 74, n. 4, p. 461–476, 1957.

MATYAR F, KAYA A, DINÇER S. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Sci Total Environ*. 2008 Dec 15;407(1):279-85. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.08.014. Epub 2008 Sep 19. PMID: 18804847.

MUNITA, J.M., ARIAS C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). 10.1128, 2016.

NICK G.H. TAYLOR, DAVID W. Verner-Jeffreys, Craig Baker-Austin, Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilizing antimicrobial resistance?, *Trends in Ecology & Evolution*, Volume 26, Issue 6, 2011, Pages 278-284, ISSN 0169-5347, <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.004>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534711000735>)

OBAYIUWANA, A. et al. Characterization of Bacterial Communities and Their Antibiotic Resistance Profiles in Wastewaters Obtained from Pharmaceutical Facilities

in Lagos and Ogun States, Nigeria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 7, p. 1365, 29 jun. 2018.

OSIŃSKA, A. et al. Impact of type of wastewater treatment process on the antibiotic resistance of bacterial populations. *E3S Web of Conferences*, v. 17, p. 00070, 2017.

OSIŃSKA, A., HARNISZ, M. & KORZENIEWSKA, E. Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. *Environ Sci Pollut Res* 23, 10818–10831 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6221-4>

PALLERONI, N.J. (2015). *Stenotrophomonas*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01237>

PATERSON, D. L.; L., D. Infections Due to Other Members of the *Enterobacteriaceae*, Including Management of Multidrug-Resistant Strains. In: *Goldman's Cecil Medicine*. Elsevier, v. 2p. 1874–1877, 2012.

PODSCHUN R, ULLMANN U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Oct;11(4):589-603. doi: 10.1128/CMR.11.4.589. PMID: 9767057; PMCID: PMC88898.

PUPO, G.M., R. LAN AND P.R. Reeves. 2000. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10567–10572.

READ, A.F., WOODS, R.J.; Antibiotic resistance management, *Evolution, Medicine, and Public Health*, Volume 2014, Issue 1, 2014, Page 147, <https://doi.org/10.1093/emph/eou024>

REYGAERT, W.C.; An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018 Jun 26;4(3):482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482. PMID: 31294229; PMCID: PMC6604941.

ROSEN, B. P., AND LIU, Z. (2009). Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environ. Int.* 35, 512–515. doi: 10.1016/j.envint.2008.07.023

RUIZ NM, RÁMIREZ-RONDA CH. Tetracyclines, macrolides, lincosamides & chloramphenicol. *Boletín de la Asociación Médica de Puerto Rico*. 1990 Jan;82(1):8-17. PMID: 2180420.

RYAN RP, MONCHY S, CARDINALE M, TAGHAVI S, CROSSMAN L, AVISON MB, BERG G, VAN DER LELIE D, DOW JM. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Jul;7(7):514-25. doi: 10.1038/nrmicro2163. PMID: 19528958.)

SAUBERAN, J. B., BRADLEY, J.S.; "Antimicrobial agents." *Principles and practice of pediatric infectious diseases*. Elsevier, 2018. 1499-1531.

SHARMA, P. C. *et al.* Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 4, p. 577–589, 17 mar. 2010.

STROCKBINE, N.A. AND MAURELLI, A.T. (2015). *Shigella*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01168>

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, v. 119, n. 6, p. S3–S10, jun. 2006.

TIMILSINA, S., POTNIS, N., NEWBERRY, E.A. *et al.* *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* 18, 415–427 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0361-8>

TITILAWO, Y., OBI, L., OKOH, A., 2015. Antimicrobial resistance determinants of *Escherichia coli* isolates recovered from some rivers in Osun State, south-western Nigeria: implications for public health. *Sci. Total Environ.* 523, 82–94.

WIREMAN, J. *et al.* Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 11, p. 4494–4503, 1997.

β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 208, p. 112829, 15 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523420308011>)