



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS-
PPGCA

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBACTERIANOS EM
BACTÉRIAS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO
TOLEDO-PR

CRISTIANE ZINE

TOLEDO - PR
MAIO / 2019

CRISTIANE ZINE

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBACTERIANOS EM
BACTÉRIAS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO
TOLEDO-PR**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Ambientais- PPGCA, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins

TOLEDO - PR

MAIO / 2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração

Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Zine, Cristiane

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBACTERIANOS EM BACTÉRIAS DA
BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TOLEDO-PR / Cristiane Zine;
orientador(a), Cleide Viviane Buzanello Martins, 2019.

34 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do
Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de
Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Ambientais, 2019.

1. Antimicrobianos. 2. Resistência. 3. Rio
Toledo. I. Buzanello Martins, Cleide Viviane . II.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cristiane Zine

“Susceptibilidade a antibacterianos em bactérias da bacia hidrográfica do Rio Toledo/PR”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cleide Viviane Buzanello Martins
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dr. Miguel Angel Aparício Rodríguez
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em: 08 de maio de 2019.
Local de defesa: Auditório do Gerpel – Unioeste Toledo.

AGRADECIMENTOS

Aminha mãe, Marili pelo apoio incondicional, incentivo e pela confiança demonstrada ao longo de minha formação pessoal e profissional.

Aos professores Cleide V. B. Martins e Pitágoras Augusto Piana pela orientação e colaboração para a realização do presente trabalho.

Aos meus amigos Auriele Machado Vieira, José Rafael Soares Fonseca, e Marinêz de Souza pelo auxílio durante as coletas das amostras e incentivo o tempo todo.

A minha amiga Adriana Tronco pela amizade, apoio e motivação.

Ao Laboratório de Saneamento da Engenharia Agrícola pela ajuda prestada na realização das análises.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização de mais essa etapa da minha vida.

Obrigada a todos!

RESUMO

ZINE, C. Susceptibilidade a antibacterianos em bactérias da bacia hidrográfica do rio Toledo-PR. 08 de maio de 2019. 33 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, maio 2019.

A resistência bacteriana é hoje tema de grande importância, uma vez que certos antibióticos estão perdendo sua eficiência a determinados microrganismos. Diante disso, é preciso compreender a ação contra metais pesados frente aos antimicrobianos, pois a presença constante de metais no ambiente como poluente faz com que microrganismos desenvolvam mecanismos de resistência a esses compostos, pois o metal pode interferir na resistência antimicrobiana dependendo do tipo de material que o rio possa estar recebendo e suas condições naturais. Assim, o objetivo do presente estudo propôs identificar se há alguma correlação entre a concentração de metais e o surgimento de resistência aos antimicrobianos. O trabalho foi realizado no período de setembro de 2018 a fevereiro de 2019. Foram estudados 10 pontos, divididos em dois trechos, rural e urbano. Para análise microbiológica foi determinado o NMP de coliformes. Para análises de resistência a antimicrobianos, os antibióticos foram adicionados ao meio de cultura nas concentrações estabelecidas. As análises físico-químicas, a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), e os metais (Pb, Ni, Fe, Cu, Mn e Cr) determinados foram realizados de acordo com APHA,(2005). Observou-se que as concentrações de Ni e Cu, são praticamente constantes ao longo do rio. Por outro lado, as concentrações de Pb e Fe apresentaram diferenças significativas ao longo de todo percurso do rio. As concentrações de metais, mesmo acima dos valores limites estabelecidos pela portaria 357/2005 do CONAMA, não apresentaram correlações com a eficiência dos antibióticos, com exceção do cátion Cu em relação ao antibiótico sulfametoxazol + trimetropim (S + T). Os coliformes fecais e termotolerantes tiveram um aumento significativo a partir do ponto 6 de amostragem. Houve um aumento da DBO5 entre o ponto 6 e 9 e posterior declínio deste parâmetro. Desta maneira, pode-se demonstrar que o rio possui uma grande capacidade de autodepuração e que no trecho 7 a 9 a interferência antropogênica é responsável pelo surgimento de uma potencial fonte de resistência bacteriana à pelo menos um dos antibióticos testados (Cefalexina).

PALAVRAS CHAVE: Antimicrobianos; Resistência; Rio Toledo.

ABSTRACT

ZINE, C. Antibacterial susceptibility in bacteria from the Toledo-PR river basin. May 8, 2019. 33 p. Dissertation (masters) - State University of Western Paraná. Toledo, may 2019.

Bacterial resistance is a major issue today, as certain antibiotics are losing their effectiveness to certain microorganisms. Given this, it is necessary to understand the action or not of heavy metals against antimicrobials, because "the constant presence of metals in the environment as a pollutant causes microorganisms to develop mechanisms of resistance to these compounds", because the metal may interfere with antimicrobial resistance depending the type of material the river may be receiving and its natural conditions. Thus, the objective of the present study was to identify if there is any correlation between the concentration of metals and the emergence of antimicrobial resistance. The study was carried out from September 2018 to February 2019. Ten points were studied, divided into two sections, rural and urban. For microbiological analysis, the multiple tube technique was used to determine the Most Probable Number. For antimicrobial resistance analyzes, antibiotics were dosed, filtered, separated into sterile vials and stored in a refrigerator until the time of use. In the physicochemical analyzes the Biochemical Oxygen Demand (BOD), and the metals were performed according to APHA, (2005). It was observed that the Ni and Cu concentrations are practically constant along the river. On the other hand, Pb and Fe concentrations showed significant differences along the entire river course. Metal concentrations, even above the limit values established by CONAMA Ordinance 357/2005, were not correlated with antibiotic efficiency, except for CU cation in relation to S + T antibiotic. The fecal and thermotolerant coliforms had a significant increase from the sampling point 6. There was an increase in BOD5 between points 6 and 9 and subsequent decline of this parameter. In this way, it can demonstrate that the river has a great capacity for self-purification and that in section 7 to 9 anthropogenic interference is responsible for the emergence of a potential source of reproductive resistance to at least one of the tested antibiotics (CEF).

KEYWORDS: Antimicrobials; Resistance; Toledo River.

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Mapa do rio Toledo com os respectivos pontos estudados.....	12
--	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Valores médios das análises físico-químicas, concentração de metais, para 10 pontos de amostragem a longo do Rio Toledo para $p \leq 0.03$	18
Tabela 2: Valores médios das análises microbiológicas, incluindo testes de susceptibilidade a antibióticos, para 10 pontos de amostragem a longo do Rio Toledo para $p \leq 0.03$	19
Tabela 3: Correlações entre as variáveis no trecho entre os pontos 1 a 5 no rio Toledo para $p \leq 0.03$	19
Tabela 4: Correlações entre as variáveis no trecho entre os pontos 6 a 10 no rio Toledo para $p \leq 0.03$	23
Tabela 5: Análise da eficiência dos antibióticos no trecho entre os pontos 6 a 10 do rio Toledo para $p \leq 0.03$	23
Tabela 6: Caracterização morfológica e coloração de Gram das bactérias resistentes aos antibióticos.	24
Tabela 7: Caracterização morfológica e coloração de Gram das bactérias resistentes aos antibióticos.	25

Sumário

1. Introdução.....	9
2. Material e métodos.....	11
2.1 Local de estudo.....	11
2.2 Descrição dos pontos de coleta no rio toledo	11
2.3 amostragem	13
2.4 Análise físico-química	14
2.4.1 Análises de metais	14
2.5 Análises microbiológicas.....	15
2.5.1 Colimetria.....	15
2.5.2 Seleção de microrganismo resistentes a antibióticos.....	15
2.5.3 Coloração de gram.....	16
2.6 Analise estatística	16
3. Resultados.....	17
5. Conclusão.....	31
6. Referência bibliográfica.....	32

1. INTRODUÇÃO

O principal impacto sobre as fontes superficiais de água, não se resume a contaminação direta pela carga orgânica comum, proveniente dos esgotos e efluentes da cadeia produtiva de aves e gado não tratados adequadamente, mas também pela introdução contínua de antibióticos ou de superbactérias no ambiente natural (PROIA *et al.*, (2018); GARCIA-ARMINSEN *et al.*, 2013). De acordo com Torres (2012), os antimicrobianos têm sido utilizados com êxito por décadas na medicina humana e veterinária. Contudo, estes compostos não são totalmente degradados nos organismos após a ingestão, sendo cerca de 30 a 90% são excretados na urina ou nas fezes, ou seja, existe a possibilidade da introdução destes produtos no meio ambiente seja pelos dejetos dos animais produzidos durante sua criação ou pelo descarte de vísceras e outros componentes durante o abate dos animais (SARMAH *et al.*, 2006).

A resistência bacteriana é hoje tema de grande importância, uma vez que certos antibióticos estão perdendo sua eficiência a determinados microrganismos (BAPTISTA, 2013).

Para Baquero *et al.* (2008) a presença de antimicrobianos no meio ambiente pode contribuir para a propagação dos genes de resistência de bactérias usualmente inofensivas tornando-as patógenos emergentes. Em geral, os sistemas aquáticos e especialmente as águas doces, com sua alta e diversa carga bacteriana, não são apenas sumidouros, no sentido de funcionar como diluente da carga poluidora, mas podem ter um importante papel na evolução, na persistência, emergência e disseminação de bactérias com alta resistência aos agentes antimicrobianos (TAYLOR, 2011). O mesmo ocorre para os metais pesados inseridos nos ambientes aquáticos e que está ligada, principalmente, a atividades antrópicas e, estes quando introduzidos nas cadeias alimentares, acabam por afetar o desenvolvimento de algas, plantas, animais, protozoários e microrganismos (GONÇALVES *et al.*, 2015).

Entretanto, a cada dia, novas bactérias surgem resistentes aos medicamentos atuais, principalmente devido a "seleção natural" que os humanos, todos os dias, contribuem através da realização do tratamento de pessoas com drogas e que conseguem produzir a morte celular da maioria das bactérias (BAPTISTA, 2013). Porém, os organismos sobreviventes a esses

medicamentos contam com algum mecanismo produzido naturalmente através de mutações, o que os auxilia na sobrevivência, portanto, a exposição contínua e muitas vezes desnecessária induz as bactérias a trocarem entre si essa informação genética, o que colabora com o surgimento de novas cepas (ALEXANDER *et al.*, 2011).

Diante disso, é preciso compreender a ação ou não dos metais pesados frente aos antimicrobianos, pois “a presença constante de metais no ambiente como poluente faz com que microrganismos desenvolvam mecanismos de resistência a esses compostos” (HAHN *et al.*, 2015), segundo os mesmos autores, o metal pode interferir na resistência antimicrobiana dependendo do tipo de material que o rio possa estar recebendo em suas condições naturais.

Nesse sentido, a Bacia do Rio Toledo sofre ações tanto do meio urbano como rural por possuir no seu curso d’água efluentes oriundos de diversas atividades, como por exemplo, a agrícola e a industrial (PEREIRA, 2016), entretanto, o aparecimento de metais pesados leva a uma preocupação pela maneira como são descartados no meio ambiente, seja no solo ou na água, uma vez que a ingestão destes pode causar o acúmulo no organismo e, ao longo do tempo, trazer consequências à saúde da população (AGOMUO, 2017). Além disso, os metais podem estar exercendo influência na resistência antimicrobiana (MARTINS *et al.*, 2017), o que torna importante seu estudo associado às características microbiológicas dos mananciais.

Portanto, a escolha dos antibióticos deste estudo baseia-se no fato destes serem os mais receitados pelos médicos e também por encontrarem - se em diversas pesquisas que serviram de base. Desse modo, esperou-se detectar se na área de estudo os metais pesados estão interferindo na resistência antimicrobiana, isso porque, de acordo com o estudo de Pathak *et al.*, (2004), os microrganismos aquáticos resistentes a antibióticos e metais aparecem como resultado da exposição a ambientes aquáticos contaminados com efluentes de indústrias associadas a metais e resíduos fecais. Assim, se faz necessário a compreensão dos efeitos destes antibióticos sobre a população bacteriana das fontes de água, de modo que se possa propor estratégias de contenção ou atenuação dos malefícios decorrentes dessas atividades que acarretam contaminação nos rios (PROIA *et al.*, 2018; GARCIA-ARMINSEN *et al.*, 2013).

Deste modo, este estudo se tornou importante, pois um ambiente aquático ao mesmo tempo pode funcionar como fonte de abastecimento e recreação para a sociedade e também pode representar muitas vezes fontes de microrganismos resistentes a antibacterianos. Assim, o presente estudo propôs identificar se há alguma correlação entre a concentração de metais e resistências aos antimicrobianos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

Para que se possa compreender a escolha dos pontos de coleta torna-se necessário primeiramente conhecer a realidade local. O Rio Toledo e os rios São Francisco Verdadeiro, Dezoito de Abril, Santa Quitéria, Guaçu e Marreco constituem os principais cursos hídricos da malha hidrográfica do município de Toledo, Paraná.

A bacia hidrográfica desse manancial é parte da Bacia do Paraná III, no Oeste do Estado do Paraná, com área de 92,0 km² com toda sua extensão englobada no território dessa cidade. Sua nascente está localizada entre os distritos de São Luiz do Oeste e Linha Gramado, com a maior parte de seu curso localizado na área urbana, desaguando no Rio São Francisco Verdadeiro. Possui como afluentes as Sangas Perdida, Golondrina, Guarani, Manaus, Pinheirinho, Capellari e Lajes (FUNTEC, 1992; TOLEDO, 2010).

2.2 DESCRIÇÃO DOS PONTOS DE COLETA NO RIO TOLEDO

O local de amostragem ponto 1, está localizado nas coordenadas geográficas: 24°44'50" S e 53°38'21" W, no distrito de São Luiz do Oeste, próximo à nascente, com mata ciliar estreita e predomínio da agricultura no entorno do local (TABORDA, 2017), conforme a figura 1.

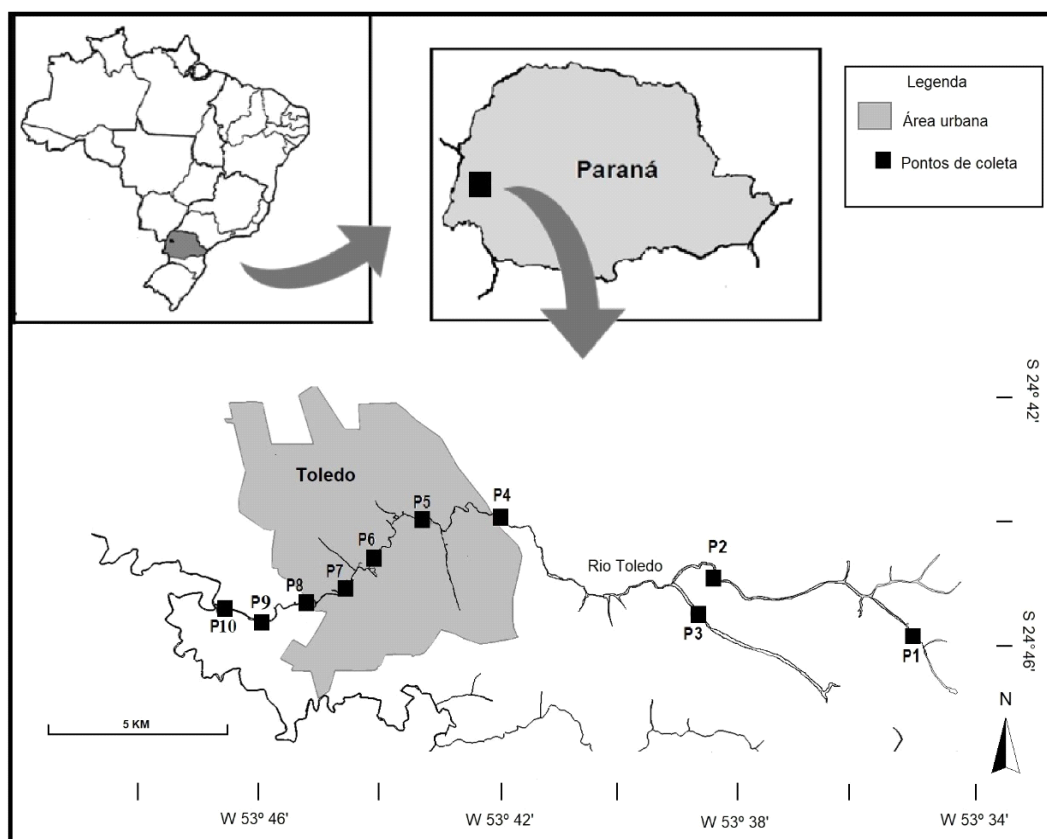


Figura 1: Mapa do rio Toledo com os respectivos pontos estudados.

O ponto 2, está localizado nas coordenadas geográficas: 24°45'44,5'' L e 53°35'2,2'' W, próximo ao distrito de Bom Princípio. O leito apresenta mata ciliar bem fechada no seu entorno, com açudes de peixe aproximadamente 50 m na margem superior do rio e um chiqueirão de porco em aproximadamente a 100 m.

O local de amostragem ponto 3, denominada Sol Nascente, está localizado nas coordenadas geográficas: 24°44'50'' S e 53°38'21'' W. O ponto é marcado por agricultura ao redor do rio. As margens encontram-se preservadas, com mata ciliar presente.

O ponto 4, está localizado nas coordenadas geográficas: 24°44'38'' S e 53°41'12'' W, próximo à estação de coleta de água para abastecimento público da Companhia de Saneamento do Paraná - SANEPAR. O leito apresenta sedimentos e pedras e as margens uma mata ciliar farta.

O local de amostragem do ponto 5, está localizado nas coordenadas geográficas: 24°43'56,2'' L e 53°43'12,9'' W. Situado no Bairro Concórdia, próximo ao espaço naturalista Kaena. A margens do rio apresenta bastante pedras e corredeira.

O ponto 6, está localizado nas coordenadas geográficas: 24°44'29,9" L e 53°44'29" W, situado no centro da cidade, próximo a estação de tratamento das lagoas da Brasil Foods (BRF). A mata ciliar bem dispersa, com bastante sedimento e lixo doméstico nas margens do rio.

O ponto 7, está localizado nas coordenadas geográficas: 24°74'49"S e 53°73'90" W, situado entre o Restaurante Pantanal e o posto de combustível Senador, próximo ao trevo da BRF. A mata ciliar se encontra bem preservada e fechada ao redor do rio.

A área de amostragem no ponto 8, está localizado nas coordenadas geográficas: 24°44'48' S e 53°44'26" W. Durante as coletas, o local apresentou odor típico de esgoto. A mata ciliar se apresentava escassa e com presença de erosão. As amostragens ocorreram próximas à ponte no contorno sul, Jardim Bressan na área urbana da cidade de Toledo - PR

O ponto 9, está localizado nas coordenadas geográficas: 24°75'73" S e 53°76'29" W. Situado próximo à pedreira municipal. As coletas foram realizadas na ponte ao lado do sítio Zanette. No leito encontram-se pedras, altos barrancos e mata ciliar com árvores de grande porte. Logo após o ponto de coleta inicia-se uma sequência de corredeiras que tornam o fluxo da água bem turbulento e favorecem a oxigenação da água. Próximo ao local, a montante se localiza o desague de uma sanga de nome desconhecido e diversos chiqueirões de suínos.

O ponto 10, está localizado nas coordenadas geográficas: 24°45'14" S e 53°46'35" W. Situado próximo à foz do Rio Toledo com o Rio São Francisco Verdadeiro, adjunto a pedreira municipal, sentido a município de Ouro Verde do Oeste - PR. A mata ciliar no entorno do rio se encontra preservada, no entanto, com presença de sedimentos, pedras em alguns trechos do leito e corredeiras.

2.3 AMOSTRAGEM

O experimento foi executado no Laboratório de Microbiologia (Unioeste/Campus Toledo) e Saneamento Ambiental (Unioeste/Campus Cascavel), no período de setembro de 2018 a fevereiro de 2019.

Para o estudo considerou-se a amostragem em 10 pontos entre trechos urbanos e rurais, representativos no percurso do rio. No período citado foram realizadas três coletas independentes em cada ponto.

As amostras foram coletadas em frascos de vidro de 200 ml devidamente esterilizados e protegidos de contaminação-cruzada, sendo que após a coleta os mesmos foram mantidos dentro de caixa térmica com gelo e encaminhados para as análises.

2.4 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Para determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), as amostras foram coletadas em galões de 5 litros, armazenadas em gelo e encaminhadas ao Laboratório de Limnologia do Grupo de Recursos Pesqueiros e Limnologia – Gerpel – Unioeste – Campus – Toledo. A análise consiste na medição do oxigênio dissolvido no início e depois da incubação incubadas a 20°C pelo período de 5 dias (APHA, 2005).

2.4.1 ANÁLISES DE METAIS

Para determinação dos elementos traço (metais) foram coletados 200 ml de água, filtradas com papel filtro qualitativo 14µm de diâmetro do poro e colocadas em frascos plásticos de 100 ml, lacrados e acondicionados em caixa com gelo. Posteriormente os mesmos foram conduzidos ao laboratório de Saneamento Ambiental de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, para serem realizadas as análises através do equipamento ICP-OES por digestão ácida (APHA, 2005).

A metodologia consistiu na digestão de 50 ml da amostra de água em 5 ml de ácido nítrico concentrado utilizando-se inicialmente o forno micro-ondas a 160°C por 10 minutos, sendo que após seu arrefecimento está foi aquecida por mais 10 minutos a uma temperatura de 170°C. Posteriormente efetuou-se a leitura por Espectrometria de Absorção Atômica por Chama, segundo a metodologia descrita pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005) para determinação das concentrações dos metais Ferro (Fe), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Níquel (Ni) e Manganês (Mn).

2.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

2.5.1 COLIMETRIA

Para determinação de bactérias do grupo Coliformes Totais (CT) e Termotolerantes (CTe) foi utilizada a técnica de tubos múltiplos (série de 3 tubos) para determinação do Número Mais Provável (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997; APHA, 2005). As amostras foram diluídas (0,1; 0,01 e 0,001) e para cada diluição foram utilizados três tubos contendo 9 ml de Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST) com tubos de Durhan invertidos. A cada um desses tubos foi adicionado assepticamente 1 ml da diluição correspondente sendo posteriormente incubados a 35°C durante 24 – 48 horas. Após o período determinado de incubação, foi realizada a leitura considerando-se resultados positivos para os tubos que apresentaram turvação e formação de gás no tubo de Durhan. Na determinação de CT, as amostras que apresentaram resultados positivos no teste de LST, foram semeadas assepticamente com o auxílio de uma alça de inoculação, em tubos contendo 10 ml de Caldo Verde Brilhante 2% contendo tubos de Durhan invertidos e foram incubados durante 48 horas em estufa a 35 - 37°C. As amostras positivas foram consideradas CT e comparadas com a tabela de Número Mais Provável.

Para cada tubo positivo de LST, também foram semeadas assepticamente alíquotas em tubos contendo 10 ml de Caldo *Escherichia coli* (EC) contendo tubos de Durhan invertidos e foram incubados durante 48 horas em banho úmido a 44,5 °C. As amostras positivas foram consideradas CTe e comparadas com a tabela de Número Mais Provável.

2.5.2 SELEÇÃO DE MICRORGANISMO RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Na análise de resistência a antimicrobianos foram testados cinco diferentes antibióticos: Cloranfenicol (8 µg/ml), Tetraciclina (16 µl/ml), Cefalexina (30 µl/ml), Sulfametaxazol + Trimetropim (125µg/ml+8µg/ml) e, Amoxilina + Clavulonato de Potássio (32µg/mL +16µg/ml) e por final, um mix de todos os antibióticos nas mesmas concentrações utilizadas em isolado. As amostras foram determinadas em função das concentrações de cada antibiótico

existentes, presentes na padronização dos testes de sensibilidade da Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2005)

Os antibióticos foram dosados, filtrados, separados em frascos esterilizados e armazenados em geladeira até o momento do uso. Posteriormente foram preparados seis erlenmeyers de meio de cultura Mueller Hilton, introduzida a dosagem de cada antibiótico e vertidos em placas de petri para realização das análises. Com exceção do Cloranfenicol os demais foram acrescentados ao meio resfriado à 50-55°C.

Posteriormente, foram inoculadas 50µl da amostra de cada ponto nas placas com seu referido antibióticos, em cada tratamento. As placas foram incubadas a 35° por 48hs e feita a contagem das Unidades Formadoras de Colônia – UFC/ml.

2.5.3 COLORAÇÃO DE GRAM

O preparo das lâminas para coloração foi feito de acordo com o Kit Laborclin (conjunto para coloração de Gram).

Foi espalhado a amostra no centro da lâmina limpa e desengordurada, deixado secar ao ar livre e passadas na chama do bico de bunsen para fixação. Após resfriada, a lâmina foi coberta com solução de violeta genciana e deixada agir por um minuto. Logo em seguida foi escorrida a solução e aplicado o segundo corante (lugol) e deixado agir, também, por um minuto. Após removido o lugol, foi gotejado sobre a lâmina, a solução descolorante até que o líquido se tornasse incolor. Por final foi lavado em água corrente e aplicado o último corante (fucsina) e deixado agir por mais 1 minuto. Terminado o processo, as lâminas foram deixadas secar e consequentemente analisadas no microscópio usando a objetiva de imersão (100 x de aumento total).

2.6 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram submetidos na análise de variância (ANOVA), posteriormente as media foram comparadas no teste de Tukey, e realizado uma análise de correlação entre as variáveis da matriz de dados com $p \leq 0,3$.

3. RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os valores médios das variáveis físico-químicas (concentração de cátions metálicos) analisadas ao longo do Rio Toledo. Estes metais (Fe, Pb, Ni, Cu) superaram os limites da portaria estabelecida pelo CONAMA. O Ni e o Cu, apresentaram valores muito baixos e ao longo do rio não obtiveram diferenças significativas, qualitativas e nem quantitativamente. O Pb e Fe apresentaram diferenças quantitativas nos pontos 9 e no caso do Pb também. Também são apresentados os resultados do teste de comparação de médias (Teste de Tukey). A Tabela 2 apresenta os resultados dos ensaios realizados com antibacterianos: Sulfametoxazol + trimetoprim (S+T) (125µg/ml + 8,0µg/ml); tetraciclina (TETRA) (16µg/ml); cloranfenicol (CLORAN) (8,0µg/ml); cefalexina (CEF) (30µg/ml); amoxilina + clavulanato de potássio (A+C) (32µg/ml + 16µg/ml). Sendo que na Tabela 2 são apresentados os valores médios de cada variável, o desvio padrão e o resultado da comparação das médias por meio do teste de Tukey. Todos os antibacterianos em meio Mueller Hinton, não apresenta diferenças significativas, ou seja, o número de colônias no meio são basicamente as mesmas, a quantidade bacteriana entre os pontos 1 e o ponto 5, então, estatisticamente não há diferenças significativas, não há mudanças no meio que induza a flora microbiana em termos de qualidade ou de quantidade, por isso, a letra a em todos os pontos até o ponto 5, incluindo todos os antibacterianos e seus controles. Em relação a DBO5 que foi medido apenas do ponto 6 ao ponto 10 se observa um pico no ponto 9 e um crescimento entre o ponto 6 e ponto 9 e um declínio no ponto 10. O que indica uma provável autodepuração entre o ponto 9 e 10. Lembrando que neste ponto há um leito de pedras e uma conservação muito boa de mata ciliar entre o ponto 8 e o ponto 9 que evita erosão, enchurradas, enfim, materias para dentro do rio. E as corredeiras que oxigenam a água, favorecendo a degradação do material orgânico. A tabela 3, pode-se demonstrar as análises de colimetria ao longo dos 10 pontos de amostragem. Os resultados dos coliformes totais e termotolerantes não obtiveram diferenças significativas, ou seja, o número de colônias microbianas no meio Mueller Hinton é basicamente as mesmas nos pontos 1 e 5. Ainda em relação as bactérias de interesse clínico, se observou um crescimento vertiginoso a partir do ponto 6, em ambos. Se observa também, mudanças significativas nos pontos 8 e 9, com pico

no ponto 9 apresentando 93333 colônias nas placas de controle com Mueller Hinton. Os efeitos dos cátions de Mn e Cr não foram considerados, pois as concentrações dos mesmos sempre estiveram abaixo do limite estabelecido pela portaria 357/2005 do CONAMA.

Tabela 1: Valores médios das análises físico-químicas, concentração de metais, para 10 pontos de amostragem a longo do Rio Toledo para $p \leq 0.03$.

Ponto	Pb (ppm)	Ni (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Cr (ppm)
1	0.2018 ± 0.0474 ^{abc}	0.0196 ± 0.0085 ^a	0.4848 ± 0.0557 ^{ab}	0.0120 ± 0.0107 ^a	0.0119 ± 0.0168 ^a	0.0116 ± 0.0049 ^a
2	0.2506 ± 0.0673 ^{abc}	0.0282 ± 0.0112 ^a	0.9053 ± 0.0759 ^a	0.0158 ± 0.0162 ^a	0.0000 ± 0.0000 ^a	0.0087 ± 0.0034 ^a
3	0.2570 ± 0.0404 ^{abc}	0.0125 ± 0.0217 ^a	0.9317 ± 0.0751 ^a	0.0147 ± 0.0134 ^a	0.0214 ± 0.0152 ^a	0.0076 ± 0.0040
4	0.2680 ± 0.0469 ^{abc}	0.0420 ± 0.0146 ^a	2.0317 ± 0.4401 ^c	0.0091 ± 0.0157 ^a	0.0518 ± 0.0733 ^a	0.0095 ± 0.0016 ^a
5	0.2934 ± 0.0650 ^{ab}	0.0157 ± 0.0068 ^a	0.9321 ± 0.1159 ^a	0.0138 ± 0.0239 ^a	0.0042 ± 0.0059 ^a	0.0088 ± 0.0052 ^a
6	0.2826 ± 0.0611 ^{ab}	0.0472 ± 0.0129 ^a	1.0408 ± 0.0810 ^a	0.0190 ± 0.0266 ^a	0.0000 ± 0.0000 ^a	0.0228 ± 0.0085 ^a
7	0.3294 ± 0.0575 ^a	0.0334 ± 0.0128 ^a	0.9138 ± 0.0953 ^a	0.0188 ± 0.0326 ^a	0.0200 ± 0.0200 ^a	0.0140 ± 0.0076 ^a
8	0.1384 ± 0.0439 ^{bc}	0.0273 ± 0.0017 ^a	0.4831 ± 0.1717 ^{ab}	0.0601 ± 0.0220 ^a	n/d	n/d
9	0.1145 ± 0.0429 ^c	0.0246 ± 0.0071 ^a	0.3233 ± 0.2816 ^b	0.0695 ± 0.0144 ^a	n/d	n/d
10	0.3159 ± 0.0474 ^a	0.0262 ± 0.0057 ^a	0.8696 ± 0.0519 ^{ab}	0.0195 ± 0.0338 ^a	0.0242 ± 0.0076 ^a	0.0181 ± 0.0067 ^a
Limite Portaria 357/2005 CONAMA – Classe 2	0.01 mg/L	0.025 mg/L	0.3 mg/L	0.009 mg/L	0.1 mg/L	0.05 mg /L
Limite Portaria 357/2005 CONAMA – Classe 3	0.033 mg/L	0.025 mg/L	5 mg/L	0.013 mg/L	0.5 mg/L	0.05 mg /L

Classe 2 – água doce (Ni 0,025 ppm e Cu 0,009 ppm); Classe 3 - água doce (Ni 0,025 ppm e Cu 0,013 ppm). Médias assinaladas com a mesma letra nas colunas implicam que não apresentam diferença significativa entre si de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 2: Valores médios dos testes realizados com os antibacterianos, para os 10 pontos de amostragem ao longo do Rio Toledo para $p \leq 0.03$.

Ponto	S+T (UFC/ml)	TETRA (UFC/ml)	CLORAN (UFC/ml)	CEF (UFC/ml)	A+C (UFC/ml)	DBO ₅ (ppm)
1	13 ± 23 ^a	33 ± 31 ^a	7 ± 12 ^a	567 ± 58 ^a	20 ± 35 ^a	n/d
2	7 ± 12 ^a	30 ± 10 ^a	20 ± 20 ^a	767 ± 12 ^a	20 ± 35 ^a	n/d
3	10 ± 17 ^a	33 ± 31 ^a	7 ± 12 ^a	300 ± 106 ^a	60 ± 20 ^a	n/d
4	37 ± 64 ^a	67 ± 61 ^a	13 ± 23 ^a	407 ± 31 ^a	40 ± 53 ^a	n/d
5	47 ± 50 ^a	100 ± 20 ^a	13 ± 23 ^a	620 ± 53 ^a	107 ± 42 ^a	n/d
6	107 ± 31 ^a	173 ± 61 ^a	120 ± 40 ^a	533 ± 42 ^a	67 ± 12 ^a	1.82 ± 0.76 ^a
7	547 ± 103 ^a	627 ± 76 ^{ab}	187 ± 50 ^a	3040 ± 231 ^a	333 ± 117 ^{ab}	2.17 ± 0.49 ^{ab}
8	1678 ± 1206 ^a	3111 ± 770 ^{bc}	867 ± 176 ^{ab}	32222 ± 3672 ^b	1167 ± 404 ^c	2.83 ± 0.56 ^{ab}
9	6022 ± 2195 ^b	5522 ± 2450 ^c	1956 ± 1317 ^b	63444 ± 23885 ^c	800 ± 291 ^{bc}	5.45 ± 1.02 ^c
10	480 ± 20 ^a	1447 ± 110 ^{ab}	707 ± 81 ^{ab}	6227 ± 889 ^a	293 ± 31 ^{ab}	3.89 ± 0.45 ^{bc}

Antibióticos: S+T Sulfametoxazol + trimetoprim (125µg/ml +8,0µg/ml); TETRA tetraciclina (16µg/ml); CLORAN cloranfenicol (8,0µg/ml); CEF cefalexina (30µg/ml); A+C amoxilina + clavulanato de potássio (32µg/ml + 16µg/ml). Médias assinaladas com a mesma letra nas colunas implicam que não apresentam diferença significativa entre si de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 3. Valores médios das análises de colimetria nos 10 pontos de amostragem ao longo do rio Toledo para $p \leq 0.03$.

Ponto	Coliformes total (NMP/ml)	Coliformes termotolerantes (NMP/ml)	Controle (UFC/ml)
1	85 ± 39 ^a	60 ± 29 ^a	1047 ± 117 ^a
2	50 ± 40 ^a	50 ± 40 ^a	890 ± 195 ^a
3	87 ± 107 ^a	67 ± 72 ^a	693 ± 70 ^a
4	191 ± 85 ^a	191 ± 85 ^a	687 ± 101 ^a
5	387 ± 127 ^b	387 ± 127 ^a	1020 ± 144 ^a
6	1100 ± 0 ^c	387 ± 127 ^a	1433 ± 252 ^a
7	2400 ± 0 ^d	887 ± 370 ^b	8180 ± 851 ^a
8	2400 ± 0 ^d	1100 ± 0 ^b	48000 ± 2404 ^b
9	2400 ± 0 ^d	2400 ± 0 ^c	93333 ± 33513 ^c
10	2400 ± 0 ^d	2400 ± 0 ^c	17000 ± 2711 ^{ab}

Controle: Meio de cultura para bactérias de interesse clínico Mueller Hilton. Médias assinaladas com a mesma letra nas colunas implicam que não apresentam diferença significativa entre si de acordo com o teste de Tukey.

Por outro lado, a análise dos dados, em relação ao efeito (correlação) dos metais sobre a eficiência: dos antibióticos, coliformes totais, coliformes termotolerantes e bactérias de interesse clínico (colônias que crescem no meio Mueller Hilton), foi realizada de forma particionada, em função da existência de dois elementos antropogênicos de elevado impacto ambiental sobre o rio Toledo, o qual recebe os efluentes de um dos maiores frigoríficos de suínos e aves da América Latina, além dos despejos da Estação de Tratamento de Esgoto - ETE da Sanepar que atuam tecnicamente dentro dos padrões estabelecidos pela norma 430/2011 do CONAMA (MMA, 2011). Desta forma, a análise dos dados

foi particionada dividindo o rio em dois trechos: o primeiro relativo aos pontos de 1 a 5 e o segundo trecho referente aos pontos de 6 a 10.

A Tabela 4 apresenta os resultados relativos à análise dos pontos de 1 a 5. Pode se observar que existe uma forte correlação positiva entre o número de coliformes termotolerantes e o número de coliformes totais, como já era esperado com $r = 0.9866$. Também é possível registrar uma correlação negativa entre a concentração de cátions Cu em relação ao número de colônias presentes nas placas com o antibiótico S+T com $r = -0.6079$. O número de coliformes totais e termotolerantes mostram correlações positivas em relação ao meio na presença do antibiótico A+C, sendo $r = 0.6618$ e $r = 0.6252$, respectivamente. Nenhuma das outras variáveis analisadas apresentam correlação entre si.

A Tabela 5 se refere aos resultados de análise de correlação entre as diversas variáveis para o trecho do rio compreendido entre os pontos 6 a 10. Além, da correlação positiva obvia entre o número de UFC/mL das placas de controle com todos os antibióticos, também é possível observar uma forte correlação negativa entre a concentração dos metais Pb e Fe com relação aos antibióticos. O Cu apresenta correlação positiva em relação ao controle, aos antibióticos TETRA e CEF, $r = 0.6640$, $r = 0.5652$ e $r = 0.6774$, respectivamente. Por outro lado, o Ni não apresenta nenhum tipo de correlação com o número de colônias presentes nas placas tratadas com antibióticos.

A Tabela 6 se refere a análise transversal da eficiência dos antibióticos na seção do rio Toledo compreendida entre os pontos 6 até 10. Esta tabela demonstra o desempenho dos antibacterianos. A parte superior da tabela mostra o número de colônias microbiana e na parte inferior calcula a eficiência e o desempenho dos antibacterianos que sobretudo é alta, acima de 90 %, praticamente de todos, com exceção da Cefalexina. De modo geral todos os antibacterianos mantêm o mesmo desempenho dos pontos 1 a 5. É importante salientar que estatisticamente e quantitativamente a Cefalexina mostra dois pontos de quedas muito expressivo que são do ponto 8 e 9, cai 50% sobre seu desempenho. Só que estatisticamente são todos exatamente iguais. Para uma melhor explicação pode existir dois motivos: primeiro, a carga microbiana aumentou exageradamente, o número de microrganismos contaminados é muito maior do que as doses do antibacteriano inseridos no local, ou seja, a carga microbiana é muito alta e a dose de Cefalexina recomendada não sortiu efeito

apesar que os demais antibacterianos deram resultados. O segundo motivo pode ser o surgimento de uma resistência induzida que não parece ser, pelo que vimos dos metais, induzidos por uma bomba de efluxo. Minha sugestão ou hipótese neste sentido seria o surgimento de uma transferência de resistência bacteriana horizontal, ou seja, algum microrganismo vindo dos efluentes de frigoríficos do abatedouro de aves ou da Estação de Tratamento da Sanepar que forma um biofilme naquela área de água estagnada que está transferindo genes para as bactérias ou elas estão se defendendo da parte contida nas amostragens e assim se defendendo localmente da Cefalexina, pois outros antibacterianos nas dosagens padronizadas conseguiram se defender, então isso nos permite, de certa forma, descartar a primeira hipótese que seria uma sobrecarga de microrganismos. Essa queda expressiva de 50% da eficiência dos antibacterianos nos pontos 8 e 9, está demonstrada estatisticamente que todos os antibacterianos funcionam perfeitamente, dentro da mesma faixa, inclusive a Cefalexina (CEF) do ponto 1 a 5. Existe duas hipóteses para este resultado: a primeira é que a dosagem da CEF de 30 µg/ml não é suficiente na ação contra a carga microbiana e a segunda hipótese, à na amostra, bactérias que apresentam surgimento de resistência específica a este antibacteriano Cefalexina. Entretanto, a afirmação para a segunda opção é a mais provável, pois, todos os outros antibacterianos mantiveram sua eficiência mesmo com esta aparente sobrecarga trazida pelos efluentes do Frigorífico e da Estação de Tratamento de Esgoto da Sanepar (ETE). No entanto, pode estar havendo uma transferência horizontal de genes nos pontos de amostragem. A Tabela 7 apresenta a caracterização morfológica e coloração de Gram das colônias formadas pelas bactérias resistentes aos antibióticos utilizados neste estudo.

Analisando a tabela 7, podemos observar a coluna da Cefalexina, exatamente no ponto 9, percebemos que a morfologia das bactérias sobreviventes na placa, são estafilococos e são 100% gram +. Na placa de controle Mueller Rinton, observamos que na maioria as colônias poderiam ser classificadas, de modo geral, em bacilos e estafilococos e, assim no final do tratamento, percebemos que temos apenas estafilococos. Teoricamente as Cefalexinas que são Gram +, deveriam ser eficientes contra este tipo de bactérias. Então se olharmos o desempenho da Cefalexina ao longo da coluna, pode-se ver que ela é eficiente, e o que sobra ao longo da coluna são bacilos,

o que era esperado, com exceção do ponto 6, só sobraram estreptococos. Então observado a tabela da Cefalexina, vemos que ao longo dos pontos iniciais até o ponto 7, basicamente a morfologia dos microrganismos sobreviventes são bacilos, entretanto, a partir do ponto 8 os sobreviventes são estafilococs. Teoricamente seriam os mais sensíveis há ação da Cefalexina, então são indicativos que estes estafilococs adquiriram essa resistência ao antibacteriano através de algum mecanismo e não é a bomba de efluxo, porque os metais aparentemente não indicam. Então deve ter vindo de microrganismos, desses efluentes, seja da ETE ou do Frigorífico, pois diversos estudos presentes no meu trabalho fala desse tipo de resistência cruzada de bactérias e cito também que hoje em dia se utiliza sais de metais na alimentação e fortificação de suínos, aves e muitas bactérias, com o uso indiscriminado dos antibacterianos pelas pessoas que terminam sendo descartados pela urina, fezes e vai parar em sistemas de esgotos, então, isso cria microrganismos que se tornam resistentes e vão acabar nestas estações de Tratamento e de uma forma ou outra isso acaba escoando pelos rios. No entanto, os indicativos dos dados parece demonstrar que há o surgimento de estafilococs que chegam até o rio com esta resistência estabelecida no seu cromossomo e provavelmente deve haver uma transferência horizontal. Isso, se acontece ou não, a gente deveria partir para estudos mais aprofundados com o uso de ferramentas genéticas para estudar estas bactérias antes ou depois dos efluentes da ETE, Frigoríficos e assim por diante. Em relação ao MIX de antibacterianos, podemos destacar o aparecimento de bacilos Gram + somente nos pontos 2, 6, 7, 8 e 10 como resistentes ao MIX e comparando com o controle podemos verificar que os demais microrganismos como estreptococos e estafilococs foram sensíveis ao MIX de antibacterianos nas dosagens estabelecidas.

Tabela 4: Correlações entre as variáveis no trecho entre os pontos 1 a 5 no rio Toledo para $p \leq 0.03$.

	Coliform Totais	Coliform Termot.	Controle	S+T	TETRA	CLORAN	CEF	A+C
Pb	.3551 p=.194	.3423 p=.212	.0052 p=.985	.3374 p=.219	.0330 p=.907	.1054 p=.708	-.0269 p=.924	.3616 p=.185
Ni	-.1726 p=.539	-.1090 p=.699	-.2303 p=.409	.0704 p=.803	.3142 p=.254	.1070 p=.704	.1203 p=.669	-.2008 p=.473
Fe	.2119 p=.448	.2584 p=.352	-.5171 p=.048	.1008 p=.721	.2280 p=.414	-.0272 p=.923	-.3636 p=.183	.1847 p=.510
Cu	.2206 p=.429	.1858 p=.507	.0249 p=.930	-.6079 p=.016	-.3306 p=.229	-.5295 p=.042	.2078 p=.457	-.0681 p=.809
Coliformes Totais	1.0000 p=---	.9866 p=.000	.1601 p=.569	.0407 p=.886	.4671 p=.079	-.3249 p=.237	.0322 p=.909	.6618 p=.007
Coliformes Termo	.9866 p=.000	1.0000 p=---	.1693 p=.546	.0807 p=.775	.5456 p=.035	-.2728 p=.325	.0488 p=.863	.6252 p=.013
Controle	.1601 p=.569	.1693 p=.546	1.0000 p=---	-.0029 p=.992	.0549 p=.846	-.0248 p=.930	.5389 p=.038	-.0617 p=.827
DBO	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

Controle: meio de cultura para bactérias de interesse clínico Mueller Hilton. Antibióticos: S+T Sulfametoxazol + trimetoprim (125µg/ml +8,0µg/ml); TETRA tetraciclina(16µg/ml); CLORAN cloranfenicol (8,0µg/ml); CEF cefalexina (30µg/ml); A+C amoxilina + clavulanato de potássio (32µg/ml + 16µg/ml). Pb (chumbo); Ni (níquel); Fe (ferro); Cu (cobre). Dados em negrito apresentam as correlações, positivas e/ou negativas entre os tratamentos.

Tabela 5: Correlações entre as variáveis no trecho entre os pontos 6 a 10 no rio Toledo para $p \leq 0.03$.

	Colifom. Totais	Coliform. Termot.	Controe	S+T	TETRA	CLORAN	CEF	A+C
Pb	-.2317 p=.406	-.2500 p=.369	-.7649 p=.001	-.6984 p=.004	-.7775 p=.001	-.6422 p=.010	-.7748 p=.001	-.7745 p=.001
Ni	-.6926 p=.004	-.5953 p=.019	-.4132 p=.126	-.3298 p=.230	-.4282 p=.111	-.4028 p=.137	-.3716 p=.173	-.4452 p=.096
Fe	-.5182 p=.048	-.4677 p=.079	-.7710 p=.001	-.7338 p=.002	-.8317 p=.000	-.7230 p=.002	-.7560 p=.001	-.8010 p=.000
Cu	.2921 p=.291	.3079 p=.264	.6640 p=.007	.5452 p=.036	.5652 p=.028	.4787 p=.071	.6774 p=.006	.4699 p=.077
Colifor mes Totais	1.0000 p=---	.6284 p=.012	.4463 p=.095	.3494 p=.202	.4626 p=.083	.3943 p=.146	.4016 p=.138	.5303 p=.042
Colifor mes Termo	.6284 p=.012	1.0000 p=---	.5613 p=.029	.5376 p=.039	.5741 p=.025	.6028 p=.017	.5078 p=.053	.2195 p=.432
Control e	.4463 p=.095	.5613 p=.029	1.0000 p=---	.9481 p=.000	.9670 p=.000	.8956 p=.000	.9967 p=.000	.5944 p=.019
DBO	.4933 p=.062	.8534 p=.000	.7430 p=.002	.7166 p=.003	.7603 p=.001	.7915 p=.000	.7091 p=.003	.4216 p=.118

Controle: meio de cultura para bactérias de interesse clínico Mueller Hilton. Antibióticos: S+T Sulfametoxazol + trimetoprim (125µg/ml +8,0µg/ml); TETRA tetraciclina(16µg/ml); CLORAN cloranfenicol (8,0µg/ml); CEF cefalexina (30µg/ml); A+C amoxilina + clavulanato de potássio (32µg/ml + 16µg/ml). Pb (chumbo); Ni (níquel); Fe (ferro); Cu (cobre). DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio). Dados em negrito apresentam as correlações, positivas e/ou negativas entre os tratamentos.

Tabela 6: Análise da eficiência dos antibióticos no trecho entre os pontos 6 a 10 do rio Toledo para $p \leq 0.03$.

	P6	P7	P8	P9	P10	
Antibiótico	Média	Média	Média	Média	Média	
Controle (UFC/ml)	1433 $\pm$ 252 ^a	8180 $\pm$ 851 ^a	48000 $\pm$ 2404 ^a	93333 $\pm$ 33513 ^a	17000 $\pm$ 2711 ^a	
S + T (UFC/ml)	107 $\pm$ 31 ^b	547 $\pm$ 103 ^b	1678 $\pm$ 1206 ^b	6022 $\pm$ 2195 ^b	480 $\pm$ 20 ^b	
TETRA (UFC/ml)	173 $\pm$ 61 ^b	627 $\pm$ 76 ^b	3111 $\pm$ 770 ^b	5522 $\pm$ 2450 ^b	1447 $\pm$ 110 ^b	
CLORAN (UFC/ml)	120 $\pm$ 40 ^b	187 $\pm$ 50 ^b	867 $\pm$ 176 ^b	1956 $\pm$ 1317 ^b	707 $\pm$ 81 ^b	
CEF (UFC/ml)	533 $\pm$ 42 ^c	3040 $\pm$ 231 ^c	32222 $\pm$ 3672 ^c	63444 $\pm$ 23885 ^a	6227 $\pm$ 889 ^c	
A + C (UFC/ml)	67 $\pm$ 12 ^b	333 $\pm$ 117 ^b	1167 $\pm$ 404 ^b	800 $\pm$ 291 ^b	293 $\pm$ 31 ^b	
Eficiência	P6	P7	P8	P9	P10	GERAL
S + T	92.56	93.32	96.50	93.55	97.18	94.62
TETRA	87.91	92.34	93.52	94.08	91.49	91.87
CLORAN	91.63	97.72	98.19	97.90	95.84	96.26
CEF	62.79	62.84	32.87	32.02	63.37	50.78
A + C	95.35	95.93	97.57	99.14	98.27	97.25

Controle: meio de cultura para bactérias de interesse clínico Mueller Hilton. Antibióticos: S+T Sulfametoxazol + trimetoprim (125 μ g/ml +8,0 μ g/ml); TETRA tetraciclina(16 μ g/ml); CLORAN cloranfenicol (8,0 μ g/ml); CEF cefalexina (30 μ g/ml); A+C amoxilina + clavulanato de potássio (32 μ g/ml + 16 μ g/ml). Médias assinaladas com a mesma letra nas colunas implicam que não apresentam diferença significativa entre si de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 7: Caracterização morfológica e coloração de Gram das bactérias resistentes aos antibióticos.

Antibiótico	S+T		TETRA		CLORAN		CEF		A+C		MIX		Controle	
Ponto	MORF.	% GRAM	MORF.	% GRAM	MORF.	% GRAM	MORF.	% GRAM	MORF.	% GRAM		% GRAM	MORF.	% GRAM
P1	bacilos	100 +	bacilos	100 +	bacilos	100 +	bacilos	100 -	bacilos	100 +		-	bacilos	50 - 50+
P2	Bacilos	100 +	Bacilos	100 +	bacilos	100 +	bacilos	100 -	bacilos	100 +	bacilos	100 +	Bacilos	43 + 57-
P3	-	-	Bacilos	100 +	Estrept.	100 +	bacilos	100 -	bacilos	100 -		-	bacilos Strept.	58,3 + 41,6 -
P4	Strept.	100 +	bacilos	100 -	bacilos	100 +	bacilos	100 -	Estrep. bacilos	91 + 9 -		-	Strept. bacilos	58,3 + 41,6 -
P5	Strept.	100 +	bacilos	100 -	Estrept.	100 +	bacilos	86 - 14 +	bacilos	100 -		-	Strept. bacilos	46,2 + 52,8 -
P6	bacilos	100 +	bacilos	100 -	bacilos	100 -	Estrept	100 +	bacilos	100 -	bacilos	100 +	bacilos Strept.	53 + 47 -
P7	bacilos	100 +	bacilos	100-	bacilos	100 -	bacilos	100 +	bacilos	100 +	bacilos	100 +	bacilos	38,5 + 61,5 -
P8	bacilos Estaf.	52 - 48 +	bacilos	100 -	bacilos Estaf.	80 - 20 +	Estaf.	100 +	bacilos	97 - 3 +	bacilos	100 +	bacilos Estaf.	94,4 - 5,5 +
P9	bacilos	96 - 4 +	bacilos	100 -	bacilos	50 + 50 -	Estaf.	100 +	Estaf. bacilos	97 - 3 +		-	bacilos Estaf.	77 - 23 +
P10	Estaf. bacilos	50 - 50 +	bacilos	100 -	Estaf.	100 +	Estaf	100 +	Estaf. bacilos	89 - 12 +	bacilos	100 +	Estaf. bacilos	23,5 - 76,5 +
Espectro de ação	Sensíveis à cocos E bacilos Gram		Ampla espectro Gram + e -		Ampla espectro Gram + e -		Sensíveis a Gram + e algumas Gram		Ampla espectro Gram + e -		Ampla espectro Gram + e -			

Controle: meio de cultura para bactérias de interesse clínico Mueller Hilton. Antibióticos: S+T Sulfametoxazol + trimetoprim (125µg/ml +8,0µg/ml); TETRA tetraciclina(16µg/ml); CLORAN cloranfenicol (8,0µg/ml); CEF cefalexina (30µg/ml); A+C amoxilina + clavulanato de potássio (32µg/ml + 16µg/ml).

4. DISCUSSÃO

É importante observar que os resultados obtidos a partir da análise estatística devem ser avaliados sob o prisma da fenomenologia dos processos envolvidos neste estudo.

Inicialmente observa-se que as concentrações de Ni e Cu (Tabela 1) são praticamente constantes ao longo de todo o percurso do rio Toledo. Em ambas as concentrações os valores médios são superiores àqueles estabelecidos pela portaria 357/2005 do CONAMA (MMA, 2005), sendo que de acordo com o trecho, o rio Toledo recebe a classificação: rio classe 2 (Ni 0,025 ppm e Cu 0,009 ppm) ou rio classe 3 (Ni 0,025 ppm e Cu 0,013 ppm).

Por outro lado, as concentrações de Pb e Fe (Tabela 1) apresentam diferenças significativas ao longo de todo o percurso do rio Toledo, sem uma tendência positiva ou negativa. Os valores médios das concentrações de Pb e Fe são superiores àqueles estabelecidos pela portaria 357/2005 do CONAMA (MMA, 2005), sendo que de acordo com o trecho, o rio Toledo recebe a classificação: rio classe 2 (Pb 0,010 ppm e Fe 0,300 ppm) ou rio classe 3 (Pb 0,033 ppm), com exceção da concentração limite de Fe (5,000 ppm) atribuída para o trecho do rio enquadrado como classe 3.

De modo geral é possível observar que a incidência de coliformes fecais e termotolerantes (Tabela 2) aumenta significativamente a partir do ponto 6 de amostragem. Ainda de acordo com os resultados expostos na Tabela 2 (placas de controle) se observa um ápice no número de colônias de bactérias de interesse clínico entre os pontos 8 e 9 com rápido declínio ao atingir o ponto 10.

De acordo com a Tabela 2 há um crescente aumento da DBO₅ entre o ponto 6 e 9 e posterior declínio deste parâmetro. Este fato somado ao declínio no número de colônias nas placas de controle parece indicar que o rio mantém sua capacidade de autodepuração. É importante lembrar que neste trecho (entre os pontos 9 e 10) que o rio Toledo possui corredeiras de grande fluxo e mantém em excelentes condições. Segundo Palma, (2007), a vazão nos pontos de coleta é fator importante e essencial para verificar autodepuração, pois o rio possui mecanismos naturais, como velocidade de degradação de materiais no ambiente aquático.

Ainda de acordo com os resultados expostos na Tabela 2, para as placas de Controle, se observa um ápice. S+T (ponto 9), TETRA (pontos 8 e 9), CLORAN (ponto 9), CEF (pontos 8 e 9) e A+C (pontos 8 e 9). Em relação ao MIX de antibióticos, à mesma tendência foi observada, ápice no ponto 9 (dados na tabela 7). Isto indica que o foco da análise deve se concentrar nos elementos que influenciam o rio no trecho contido entre os pontos 7 e 9. Seja pelo aumento da carga microbiana e orgânica despejada, ou ainda, pela presença de bactérias resistentes aos antibióticos.

A Tabela 3 indica que as concentrações de metais, mesmo acima dos valores limites estabelecidos pela portaria 357/2005 do CONAMA (MMA, 2005), não apresentam correlações com a eficiência dos antibióticos, com exceção do cátion Cu em relação ao antibiótico S+T, para a qual o valor de $r = -0,6079$. Contudo, a eficiência deste antibiótico entre os pontos 1 a 5 é superior a 94%.

Os resultados da análise estatística contidos na Tabela 3 também indicam que entre os pontos 1 a 5, existem apenas correlações óbvias, tais como: a dependência positiva da concentração no NMP/ml dos coliformes totais e termotolerantes em relação aos pontos de amostragem; e a dependência positiva do NMP/mL de coliformes termotolerantes em relação ao NMP/ml de coliformes totais.

A Tabela 4 apresenta correlações negativas entre as concentrações dos cátions de Pb e Fe e o número de colônias que crescem nas placas com antibióticos. Isto indica que o aumento da concentração de Pb e Fe favorece a diminuição no número de colônias de microrganismos nas placas que contém os antibacterianos. Honzel *et al.* (2012) observa que o mercúrio e o chumbo não estão associados com qualquer reação bioquímica conhecida do metabolismo microbiano, sua ação se baseia na inibição crescimento populacional microbiano e não ativando qualquer sistema de resistência. Não foi possível determinar um fundamento teórico-prático para a correlação negativa do cátion Fe e o número de microrganismos que resistem nas placas com antibióticos. De qualquer modo este tipo de correlação estaria indicando que o aumento das concentrações de Pb e Fe estariam agindo em pró do aumento da eficiência dos antibióticos.

Ainda em relação a Tabela 4 se observa que a concentração de Ni não demonstra qualquer relação com o número de colônias que crescem nos antibióticos. Enquanto, que a concentração de Cu mostra uma correlação

positiva com relação aos antibióticos TETRA ($r = 0,5652$) e CEF ($r = 0,6774$). Isto indica que o aumento da concentração de Cu induz a sensibilidade dos microrganismos presentes nas placas com antibacterianos. Contudo, a eficiência do antibiótico TETRA foi em média de 91,87 (conforme Tabela 5) para o trecho do rio entre os pontos 6 a 10 não diferindo significativamente daquele observado no primeiro trecho do rio entre os pontos 1 a 5 (93,82% calculado a partir da Tabela 2).

Ainda de acordo com os valores de eficiência observados na Tabela 5, entre os pontos 6 a 10, foi possível perceber que o antibiótico CEF é o único antibiótico que apresenta um grau de eficiência significativamente diferente dos demais antibióticos testados. Também foi possível registrar que a eficiência deste antibiótico diminui significativamente nos pontos 8 e 9 caindo de aproximadamente de 62% para 32% quando comparados com os pontos a jusante e montante. Isto reforça a ideia observada na Tabela 2 de que o trecho compreendido entre os pontos 7 e 9 deve concentrar os efeitos de carga orgânica ou surgimento de resistência microbiana. Esta resistência deve surgir por efeito do íon Cu sobre células microbianas que já apresentam no seu bojo genético essa resistência aos antibióticos, ou ainda, pela transferência horizontal via plasmídeos.

De acordo com a Tabela 6 foi possível perceber que no trecho entre os pontos 1 a 5 as colônias sobreviventes nas placas dos antibióticos (S+T, TETRA, CLORAN e A+C) foram quase que na totalidade Gram-positivas. A única exceção são as placas que contêm o antibiótico CEF nas quais predominaram as colônias Gram-negativas.

Lembrando que cefalexina (CEF) é um antibiótico que pode tratar uma série de infecções bacterianas. Este antibiótico mata as bactérias Gram-positivas e algumas bactérias Gram-negativas, perturbando o crescimento da parede celular bacteriana. A cefalexina é um antibiótico β -lactâmico dentro da classe da primeira geração de cefalosporinas. Sendo que a resistência a este antibiótico hoje é algo particularmente comum entre diversas cepas de microrganismos Gram-negativos de interesse clínico (ARZANLOU, CHAI e VENTER, 2017). Este fato explicaria os resultados observados, no que se refere a morfologia e coloração de Gram, no primeiro trecho rio, onde a resistência ao antibiótico CEF é praticamente de bactérias Gram-negativas (Tabela 6).

Por outro lado, os resultados apresentados na Tabela 6 demonstram que as cepas resistentes ao antibiótico CEF são Gram-positivas, no trecho do rio considerado crítico (percurso do rio entre os pontos 7 a 9) e a morfologia das cepas isoladas é do tipo estafilococos em sua grande maioria.

De acordo com Levin *et al.* (2014) as cefalosporinas de primeira geração, na quais se inclui a cefalexina, são indicadas para o tratamento de bactérias Gram-positivas (*Streptococos*, *estafilococos*, *enterococos*). Neste ponto parece surgir uma contradição quando observados os resultados da Tabela 6 referentes ao antibiótico CEF.

Lembremos que existem quatro mecanismos básicos de resistência aos antibióticos: a alteração da permeabilidade da membrana, a alteração do local de ação, as bombas de efluxo e o mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antibiótico (PELEG, 2008). Diversas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, em especial aquelas que pertencem ao grupo dos coliformes, apresentam um mecanismo enzimático de defesa que consiste na quebra do anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas inativando o antibiótico (BAPTISTA, 2013).

Observe-se que no trecho sob análise (pontos de 7 até 9) ocorrem os lançamentos dos efluentes de uma grande empresa agroalimentar de abate de aves e suínos e da estação de tratamento de esgoto da SANEPAR. O efeito dessas descargas em termos de DBO₅ e concentração de coliformes totais e fecais podem ser observadas na Tabela 2. Isto parece indicar que material gênico de bactérias da família *Enterobacteriaceae* com potencial de resistência natural ao cefalosporinas esteja disponível nesse material gênico.

Por outro lado, o trecho do rio citado apresenta condições favoráveis a formação de biofilmes junto aos sedimentos formados no leito do rio, seja de bactérias gram-positivas adaptadas ou gram-negativas, e que podem ter forte influência sob a transferência de genes de resistência entre cepas bacterianas da mesma espécie ou diferentes. Contudo, este não foi o foco do presente trabalho.

Entretanto, é importante observar que segundo Pena da Costa e Silva Junior (2017) o surgimento de resistência bacteriana pode ser classificado em três tipos: intrínseco/natural, mutagênico induzido por agentes externos e

adquirida pela aquisição de material genético exógeno por transferência horizontal de genes.

Ao analisar os resultados da Tabela 5 se registra queda na eficiência do antibiótico CEF, em torno de 50%, nos pontos 8 e 9 em relação aos pontos a jusante e montante. Fato que fortalece a hipótese que pode haver uma transferência horizontal de genes de resistência em especial entre as bactérias localizadas nos sedimentos do leito do rio e da água corrente.

Também é importante observar que os genes envolvidos devem estar relacionados especificamente com a degradação enzimática do anel β -lactâmico, pois nenhum dos outros antibióticos foi afetado em grau significativo, inclusive o conjunto A+C, onde a amoxicilina também é um tipo de antibiótico com o mesmo princípio de ação e a mesma fragilidade. O que significa que o espectro da enzima β -lactamase, codificada nos genes transferidos, não poderão afetar ou ter efeito o anel β -lactâmico da amoxicilina.

Segundo Ferreira e Souza (2000) diversas espécies de estafilococos têm grande importância clínica. Por outro lado, o trabalho de Kawata (2014) indicou que as águas superficiais do Ribeirão Jacutinga, mesmo se enquadrando dentro dos parâmetros legais estabelecidos pela Resolução 357/2005 e 430/2011 do CONAMA, apresentou elevados valores no número de colônias de *Staphylococcus aureus*, em pontos de amostragem próximos as áreas de descartes de efluentes de um frigorífico e de uma estação de tratamento de esgoto.

Quando se pensa que somente a partir de 1998, por meio de diversas portarias, ofícios e instruções normativas, a Secretaria de Defesa Agropecuária iniciou a exclusão, ou seja a proibição, de diversos antibacterianos que eram permitidos e largamente utilizados na criação de animais, em especial aves, suínos e gado bovino (MAPA, 2018a). E que somente a Portaria n. 171 (MAPA, 2018b) se tornou o marco legal que banuiu completamente o uso de qualquer antibiótico de importância na medicina humana, como aditivo zootécnico de melhoramento no desempenho de animais produtores de alimentos. Deve se imaginar o tipo e a diversidade da microbiota acumulada no biofilme possivelmente existente nesse trecho do Rio Toledo (pontos 7 a 9). Aliás não é necessário imaginar, pois dados recentes indicam que apesar das proibições legais ainda é possível determinar a presença de produtos proibidos na indústria

de aves, suínos e bovinos e seus derivados de acordo com Ariseto-Bragotto, Block e Feltes (2017).

5. CONCLUSÃO

Os dados compilados e a discussão previamente apresentada indicam que pontos positivos e negativos no status do rio Toledo podem ser elencados:

- De modo geral ao longo do rio são respeitados os limites estabelecidos em termos microbiológicos pela legislação de acordo com a classificação do trecho do rio tipo 2 ou 3;
- Os limites referentes a diversos cátions metálicos são ultrapassados sistematicamente ao longo do rio, inclusive próximo da nascente;
- O trecho inicial do rio está relativamente bem conservado e não apresenta contaminação coliformes totais e fecais expressivas (pontos 1 a 5);
- A contaminação por coliformes totais, fecais e bactérias totais é expressivo no segundo trecho do rio em especial entre os pontos 7 a 9;
- Contudo, o rio demonstra uma grande capacidade de autodepuração pela diminuição na carga orgânica (DBO_5) e UFC/ml nas placas de controle de Mill Hinton decorrentes da conservação da mata ciliar do entorno do trecho (pontos 8 a 10) e a existência de corredeiras no trecho final (9 a 10);
- Não há evidências que qualquer um dos metais induza ao surgimento de resistência bacterina por meio de ativação de bombas de efluxo;
- Existem indicativos que no trecho 7 a 9 a interferência antropogênica é responsável pelo surgimento de uma potencial fonte de bactérias resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados (CEF);
- A resistência observada pode ser em decorrência de uma transferência horizontal de genes entre membros do biofilme do leito do rio e as bactérias de passagens, ou ainda, a manifestação gênica de bactérias do filme que se desprende ao longo do tempo; isto é reforçado pelo fato que a queda abrupta está restrita aos pontos de amostragem 8 e 9.
- A resistência deve ser dada pela produção de uma enzima β -lactamase que afete especificamente cefalosporinas e não atinga amoxilina.

O aprofundamento do trabalho em termos de genética ou testes bioquímicos poderia fornecer maiores informações sobre as espécies bacterianas resistentes e os genes envolvidos. Bem como a confirmação sobre os mecanismos de transferência de genes e sua possível fonte ou origem. Isso implicaria na análise inclusive dos afluentes das estações de tratamento das interferências antropogênicas citadas.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGOMUO, E. N. & AMADI, P. U. 2017. Accumulation and toxicological risk assessments of heavy metals of top soils from markets in Owerri, Imo state, Nigeria. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 8, 121.

ALEXANDER, T.W., YANKE, J.L., REUTER, T., TOPP, E., READ, R.R., SELINGER, B.L. & MCALLISTER, T.A., 2011. Longitudinal characterization of antimicrobial resistance genes in feces shed from cattle fed different sub-therapeutic antibiotics. *BMC Microbiol*, 11, 19.

APHA – American Public Health Association, 2005. *Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater*. Washington. 22 edition.

Arisseto-Bragotto, A. P.; Block, J. M.; Feltes, M. M. C. Food quality and safety progress in the Brazilian food and beverage industry: chemical hazards. *Food Quality and Safety* (2017), V 1, n. 2, pp 117 - 129.

ARZANLOU, M; CHAI, W. C; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in Biochemistry* (2017), v. 61, pp. 49 - 59.

BAPTISTA, M. G. F.M. (2013). *Mecanismos de Resistência aos Antibióticos* (Dissertação). Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia de Lisboa.

BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J. L. & CANTÓN, R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, 19, 260-265.

FUNTEC. 1992. Recuperação ambiental da bacia hidrográfica do rio Toledo. Toledo-PR.

GARCIA-ARMISEN, T., ANZIL, A., CORNELIS, P., CHEVREUIL, M. & SERVAIS, P. 2013. Identification of antimicrobial resistant bacteria in rivers: insights into the cultivation bias. *Water research*, 47, 4938-4947.

GONÇALVES, P. E. R. S., OLIVEIRA, A. P., CRUZ, I. F., ZEILHOFER, P. & DORES, E. F. G. C. 2015. Distribuição espacial de metais potencialmente tóxicos em água superficial nas bacias dos rios Cuiabá e São Lourenço-MT. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 20, 157- 168.

HAHN, A. B. B., BAHLIS, M. G., BASSO, A. P., & VAN DER SAND, S. T. 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, 155-164.

KAWATA, R. M. Bactérias potencialmente patogênicas em trecho do Ribeirão Jacutinga - PR, após despejo de esgoto sanitário tratado. 2014. 79 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

LEVIN, A. S. S.; KOBATA, C. H. P; LITVOC, M. N. Princípios de uso de antimicrobianos: perguntas e respostas. *Revista de Medicina* (2014), v. 93, n. 2, pp. 63 -68.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2018a). Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA. Arquivos de Insumos Pecuários. Insumos proibidos no Brasil. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/>. Acessado em: 12/04/2019.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2018b). Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria Nº 171, DE 13 de Dezembro de 2018. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

MARTINS, N. H. de C. 2017. Resistência Aos Metais Pesados Em Bactérias De Importância Médica Isoladas De Ambientes Aquáticos No Brasil: Uma Revisão Sistemática. (*Monografia*) Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

MMA - Ministério do Meio Ambiente, Conselho do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução CONAMA Nº 357, DE 17 de Março de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* (2008), v. 21, n. 3, pp. 538 - 582.

PENA da COSTA, A. L.; SILVA JÚNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica UNIFAP* (2017), v.7, n. 2, pp 45 – 57.

PEREIRA, E. A. 2016. Exaustão das águas: o que mudou no Rio Toledo e no potencial hídrico no município de Toledo – PR no período de 1985 a 2010. 2016.113 f. (*Dissertação*) Mestrado em Ciências Ambientais - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo-PR.

PROIA, L., ANZIL, A., SUBIRATS, J., BORREGO, C., FARRÉ, M., LLORCA, M. & SERVAIS, P. 2018. Antibiotic resistance along an urban river impacted by treated wastewaters. *Science of The Total Environment*, 628, 453-466.

SARMAH, A.K., MEYER, M.T. & BOXALL, A. B. A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, 65:725-759.

SILVA, N. D., JUNQUEIRA, V. C. & SILVEIRA, N. F. 2001. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. VARELA.

TABORDA, J. (2017). Avaliação dos aspectos físico-químicos e microbiológicos para determinação do índice de qualidade da água–IQA no Rio Toledo–PR. (*Dissertação*) de Mestrado em Ciências Ambientais.

TAYLOR, N. G., VERNER-JEFFREYS, D. W. & BAKER-AUSTIN, C. 2011. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance. *Trends in ecology & evolution*, 26, 278-284.

TOLEDO. Plano Diretor Participativo. 2010. disponível em:
<http://www.toledo.pr.gov.br/portal/plano-diretor-participativo-toledo-2050>.
Acesso em: 30.09.2018.

TORRES, 2012 RBRH – *Revista Brasileira de Recursos Hídricos* 17, 61-67.