

**Deborah de Oliveira Santoro**

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DO RESÍDUO LÍQUIDO  
HOSPITALAR EM ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E NA DIVERSIDADE DE  
*Pseudomonas spp.*

PPGVS / INCQS

FIOCRUZ

2011

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DO RESÍDUO LÍQUIDO  
HOSPITALAR EM ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E NA DIVERSIDADE DE  
*Pseudomonas* spp.

**Deborah de Oliveira Santoro**

Mestrado Acadêmico

Programa de Pós – Graduação em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Rio de Janeiro

2011

Santoro, Deborah de Oliveira

Avaliação da influência do tratamento do resíduo líquido hospitalar em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e na diversidade de *Pseudomonas* spp./ Deborah de Oliveira Santoro. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2011.

112 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

Orientadora: Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino

1. Resíduo líquido hospitalar. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Bactérias multirresistentes. 4. Metagenômica

Evaluation of the influence of wastewater treatment on *Pseudomonas aeruginosa* isolates and the diversity of *Pseudomonas* spp.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação da influência do tratamento do resíduo líquido hospitalar em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e na diversidade de *Pseudomonas* spp.

Deborah de Oliveira Santoro

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado:

---

Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (INCQS/FIOCRUZ)

---

Dra. Danielle Frias Ribeiro Bisaggio (IFRJ)

---

Dra. Raquel Silva Peixoto (UFRJ)

---

Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino (INCQS/FIOCRUZ) - Orientadora

Rio de Janeiro

2011

Se você quer os acertos, esteja preparado para os erros.

Carl Yastrzemski

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente dedico este trabalho a Deus por mais uma etapa vencida e pelo objetivo alcançado. Obrigada, meu Deus, por ter me dado saúde e uma belíssima família como suporte de minha vida. Para sempre serei grata.

Aos meus adorados pais, pelos exemplos de luta, perseverança, amor, dedicação, zelo e carinho, por todos os dias de minha vida.

Ao meu pai, trabalhador, vencedor e exemplo na minha vida.

À minha mãe, por sempre estar ao meu lado, me incentivando e me apoiando.

Vocês sempre serão exemplos a serem seguidos. Amo vocês.

Dedico essa conquista aos meus pais, a minha irmã e ao meu irmão.

À minha orientadora Maysa Beatriz Mandetta Clementino, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade, pela oportunidade e por ter me aceitado como sua aluna.

À Priscila Nóbrega, pela força que me deu quando precisei, pela sua amizade que prezo tanto, muito obrigada, minha grande amiga. Você é uma pessoa muito especial. Continue sendo essa pessoa cheia de determinação e inteligência. Desejo muito sucesso no seu doutorado e que todos os objetivos almejados por você sejam alcançados. Obrigada por tudo.

À Coordenação da Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

À Fundação Oswaldo Cruz, por me oferecer tantos recursos e oportunidades para executar os trabalhos e contribuir para a ciência.

Agradeço a Subsecretaria de Gestão das Bacias Hidrográficas - Rio-Águas, Prefeitura do Rio de Janeiro e ao Hospital Municipal Lourenço Jorge que gentilmente autorizou a coleta das águas residuais e das amostras clínicas.

Aos colegas do Laboratório de Micro-organismos de Referência, meu muito obrigado. Em especial ao Prof. Dr. Ivano R. V. de Filippis Capasso, pelos conhecimentos compartilhados, à Cátia Chaia por todas as dúvidas resolvidas, pelas informações preciosas e pelo auxílio nos experimentos e à Ana Paula (Aninha), pela paciência, tranquilidade e meiguice ao me ajudar nos experimentos.

Ao pesquisador Dr. Ricardo P. Vieira pelos valiosos conhecimentos transmitidos e ao Alexander M. Cardoso por toda contribuição na análise dos resultados (bioinformática).

Aos professores membros da Banca Examinadora, pela gentileza em participar da banca, pelo tempo e atenção que dispensaram ao meu trabalho e por terem contribuído com seus valiosos comentários, observações, críticas e sugestões.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que não têm seus nomes presentes nestes agradecimentos, o meu muito obrigada!

## RESUMO

O esgoto hospitalar ocupa uma posição de extrema importância pela capacidade de impactar o meio ambiente e gerar implicações à saúde pública. A *Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais micro-organismos recuperados de efluentes hospitalares. Neste estudo, utilizamos uma abordagem polifásica com o objetivo de avaliar a influência do tratamento do resíduo líquido hospitalar nos isolados de *P. aeruginosa* e na diversidade de *Pseudomonas* spp. Quarenta e três isolados de *P. aeruginosa* obtidos a partir da ETE hospitalar (n=27) e amostras clínicas (n=16) foram analisados quanto ao perfil de susceptibilidade a 12 antibióticos por método de difusão em disco. Dos 27 isolados de *P. aeruginosa* do esgoto hospitalar, 62,9% apresentaram resistência ao aztreonam, seguido por ticarcilina/ácido clavulânico (33,3%) e cefepima (22,2%). Isolados clínicos resistentes ao aztreonam foram 50%, seguido por ciprofloxacina e ceftazidima (43,7%). Foram construídas cinco bibliotecas do gene 16S ribossomal (16S rRNA) correspondentes as cinco etapas da ETE hospitalar que resultaram em 93 sequências que deram origem a 41 unidades taxonômicas operacionais (OTU). Na construção da árvore filogenética, 11 OTUs são formadas por clones presentes em mais de uma etapa do tratamento, que podem ser melhor visualizadas pelo diagrama de Venn que demonstrou a pequena relação das comunidades da ETE hospitalar. As análises pelo  $\beta$ -LIBSHUFF indicaram valores de  $p > 0,0001$  entre as análises comparativas das bibliotecas demonstrando ausência de diferenças significativas. A representação gráfica baseada nas informações filogenéticas gerada pelo programa UniFrac permitiu observar diferenças entre as comunidades dos cinco pontos da ETE hospitalar. A presença de espécies com atividades biodegradadoras demonstra a valiosa contribuição desses organismos no tratamento desses resíduos. Por outro lado, os isolados multirresistentes no efluente tratado, alerta para a necessidade de aprimoramento desses sistemas a fim de evitar o lançamento de patógenos e genes de resistência nos corpos hídricos, que podem provocar grande impacto ao ambiente e à saúde pública.



## ABSTRACT

Hospital sewage treatment plants are important issues because of its capability to impact the environment with public health implications. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main microorganisms recovered from hospital sewage. We have used a polyphasic approach aiming to evaluate the influence of hospital residual treatments on *P. aeruginosa* isolates and *Pseudomonas* spp. diversity. Forty three isolates of *P. aeruginosa* were collected from the hospital STP (n=27) and clinical samples (n=16) and were analyzed on their susceptibility pattern for 12 antimicrobials by the disc diffusion method. Among 27 *P. aeruginosa* isolates, 62.9% showed aztreonam resistance, followed by ticarcillin/clavulanic acid (33.3%) and cefepime (22.2%). Clinical isolates showing resistance to aztreonam were 50%, followed by ciprofloxacin and ceftazidime (43.7%). Five genomic libraries of 16S rRNA gene were constructed. These libraries corresponded to the 5 sewage treatment steps yielding 93 sequences giving 41 Operational Taxonomic Units (OTU). On the phylogenetic tree, 11 OTU are formed by clones from more than one treatment steps, which can be better visualized by the Venn diagram showing low relationship among hospital STP communities. J-LIBSHUFF analysis showed p-values of  $> 0.0001$  among comparative analysis of libraries showing no significant differences. Graphic representation based on phylogenetic informations generated by UniFrac software, allowed to observe differences among the five hospital STP communities. The presence of species with biodegradation activities shows the valuable contribution of these organisms for residual treatment. On the other hand, the presence of multiresistant isolates from the treated effluent, alerts for the need of improvement of these systems to avoid the introduction of pathogens and resistance genes in water ecosystems, which can cause huge environmental and health impact.

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

**2- HBP** - 2-hydroxybiphenyl

**16S rRNA** - gene 16S do ácido ribonucléico ribossomal

**16S rDNA** - gene 16S do ácido desoxirribonucléico ribossomal

**A** - adenina

**ABNT** - Associação Brasileira de Normas Técnicas

**AIDS** - Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

**AmpC** - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**Art.** - Artigo

**ATCC** - American Type Culture Collection

**BHI** - Brain Heart Infusion Broth

**BLAST** - Basic local alignment search tool

**C** - citosina

**°C** - Grau Celsius

**CEDAE** - Companhia Estadual de Águas e Esgotos

**CG** - Circle Grow

**CLSI** - Clinical and Laboratory Standard Institute

**cm** - centímetro

**CNES** - Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde

**CONAMA** - Conselho Nacional de Meio Ambiente

**DATASUS** - Banco de dados do Sistema Único de Saúde

**DNA** - Ácido desoxirribonucléico

**dNTPs** - Deoxinucleotídeo trifosfato

**DTT** - Ditioneitol

**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético

**ESBL** - Extended spectrum beta-lactamases (beta-lactamases de espectro estendido)

**ETE** - Estação de Tratamento de Esgoto

**FIOCRUZ** - Fundação Instituto Oswaldo Cruz

**G** - guanina

**g** - grama

**GET** - Glicose-EDTA-Tris

**GO** - Goiás

**H<sup>+</sup>** - íons de hidrogênio

**HCl** - ácido clorídrico

**HIV** - Human Immunodeficiency Vírus (vírus humano da imunodeficiência)

**HMLJ** - Hospital Municipal Lourenço Jorge

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**INCQS** - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**IPTG** - isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo

**Km** - quilômetro

**Kv** - quilovolts

**L** - litro

**LB** - Luria Bertani

**LMR** - Laboratório de Micro-organismos de Referência

**MDR** - Multidrogas resistente

**MEGA** - Molecular Evolutionary Genetics Analysis

**mg** - miligrama

**MgCl<sub>2</sub>** - cloreto de magnésio

**mL** - mililitro

**MLD** - Maternidade Leila Diniz

**mM** - milimolar

**mm** - milímetro

**mm<sup>3</sup>** - metros cúbicos

**mS** - miliSiemens

**n<sup>o</sup>** - número

**NaOAc** - Acetato de sódio

**NaOH** - Hidróxido de sódio

**NBR** - Norma Brasileira Regulamentadora

**NCBI** - National Center for Biotechnology Information

**ng** - nanograma

**nm** - nanômetro

**O** - Oeste

**OD** - Oxigênio dissolvido

**OTU** - Operational Taxonomic Units (unidades taxonômicas operacionais)

**pb** - pares de base

**PBP** - Penicilin binding protein (proteínas ligadoras de penicilinas)

**PBS** - Tampão fosfato em salina

**PCA** - Principal components analyses (análise de componentes principais)

**PCR** - Polymerase chain reaction (reação em cadeia pela polimerase)

**pH** - potencial de hidrogênio

**PM** - peso molecular

**pmol** - picomol

**ppm** - parte por milhão

**q.s.p** - quantidade suficiente para

**RDC** - Resolução da Diretoria Colegiada

**rDNA** - DNA ribossomal

**RDP II** - Ribosomal Database Project II

**Rio-Águas** - Subsecretaria de Águas Municipais

**RJ** - Rio de Janeiro

**RNA** - Ácido ribonucléico

**RNase** - Ribonuclease

**rpm** - rotações por minuto

**RS** - Rio Grande do Sul

**RSS** - Resíduos de Serviços de Saúde

**S** - Sul

**SC** - Santa Catarina

**SENTRY** - Worldwide Antimicrobial Surveillance Program (Programa de Vigilância Epidemiológica e de Resistência Antimicrobiana)

**SDS** - sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

**SMAC** - Secretaria Municipal de Meio Ambiente

**SSU rRNA** - small subunit ribosomal RNA (subunidade menor do rRNA)

**STP** - sewage treatment plant

**SUS** - Sistema Único de Saúde

**T** - timina

**TBE** - Tris-borato EDTA

**TAE** - Tris-acetato EDTA

**UFC** - Unidade formadora de colônia

**UI** - Unidade Internacional

**UniFrac** - Unique fraction metric

**UNT** - Unidade Nefelométrica de Turbidez

**UTI** - Unidade de Tratamento Intensivo

**v/v** - volume por volume

**X-GAL** - 5-bromo-4-cloro-3-indoyl-beta-D-galactosídeo

**μg** - micrograma

**μF** - microfarad

**μL** - microlitro

**μM** - micromolar

**Ω** - ohm

**α** - alfa

**β** - beta

**γ** - gama

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores para amplificação do gene 16S RNA utilizados neste estudo.....	42
Tabela 2	Parâmetros físicos e químicos dos pontos de coleta da estação de tratamento de esgoto.....	55
Tabela 3	Relação dos isolados nos pontos de coleta das amostras.....	56
Tabela 4	Susceptibilidade (%) dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> nos 4 pontos de coleta.....	60
Tabela 5	Frequência de resistência (%) observada nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> da ETE (Ambiente I) e de amostras clínicas (Ambiente II).....	67
Tabela 6	Valores de 'p' calculado nas comparações entre as bibliotecas de 16S rDNA das comunidades microbianas usando o J- LIBSHUFF.....	72

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição dos 16 isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> provenientes de diversos setores médicos do HMLJ.....	39
Gráfico 2	Resultados da provas bioquímicas dos 29 isolados.....	56
Gráfico 3	Porcentagem de resistência dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> nas quatro etapas da ETE hospitalar.....	61
Gráfico 4	Perfil de susceptibilidade das cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas da ETE.....	62
Gráfico 5	Percentual de susceptibilidade (%) das cepas de <i>P. aeruginosa</i> por local de isolamento.....	64
Gráfico 6	Percentual de resistência (%) das cepas de <i>P. aeruginosa</i> por local de isolamento frente a classe de antimicrobianos.....	65
Gráfico 7	Percentual de resistência (%) ao aztreonam dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> em cada ponto de coleta da ETE enas amostras clínicas.....	66
Gráfico 8	Composição dos diferentes gêneros baseados na classificação das sequências parciais do gene 16S das bactérias da ETE usando a ferramenta <i>Classifier</i> do banco de dados RDP-II.....	69
Gráfico 9	Análise de Componentes Principais (PCA) de 5 comunidades microbianas do resíduo líquido hospitalar estudado, utilizando as distâncias geradas pelo UniFrac.....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A	Morfologia e Estrutura da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Coloração de Gram – bacilos Gram negativos.....	24
Figura 1 B	Ilustração da célula com flagelos.....	24
Figura 2	Esquema adaptado das etapas da metagenômica.....	32
Figura 3	Esquema da estação de tratamento de esgoto do complexo hospitalar Lourenço Jorge / Leila Diniz.....	36
Figura 4 A	Vista panorâmica da estação de tratamento de esgoto estudada.....	38
Figura 4 B	Vista panorâmica da estação de tratamento de esgoto estudada.....	38
Figura 5	Classes e mecanismos de ação dos antimicrobianos utilizados.....	45
Figura 6	Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	48
Figura 7A	Reação da PCR com iniciadores específicos para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	58
Figura 7B	Reação da PCR com iniciadores para o gênero <i>Pseudomonas</i> .....	59
Figura 7C	Reação da PCR com iniciadores universais do gene 16S rRNA.....	59
Figura 8	Diagrama de Venn baseado nas OTUs das bibliotecas do gene 16S rRNA de <i>Pseudomonas</i> dos pontos de coleta da ETE hospitalar.....	68
Figura 9	Árvore filogenética dos clones bacterianos obtidos nas bibliotecas das 5 etapas da ETE hospitalar.....	71



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1. Legislação.....	19
1.2. Resíduos de Serviços de Saúde.....	20
1.2.1. Efluente hospitalar.....	21
1.3. Gênero <i>Pseudomonas</i> .....	23
1.3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
1.4. Parâmetros físicos e químicos.....	27
1.5. Situação atual na América Latina e no Brasil.....	28
1.6. Metagenômica.....	30
1.7. O gene 16S rRNA como marcador molecular.....	33
1.8. Estação de Tratamento de Esgoto do Complexo hospitalar.....	34
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
2.1. Geral.....	37
2.2. Específicos.....	37
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>38</b>
3.1. Ambiente selecionado para o estudo.....	38
3.1.1. Hospital Municipal Lourenço Jorge e Maternidade Leila Diniz.....	38
3.2. Amostragem.....	38
3.3. Dosagem dos parâmetros físicos e químicos.....	40
3.4. Isolamento e Identificação fenotípica de <i>P. aeruginosa</i> .....	40
3.5. Identificação molecular de <i>P. aeruginosa</i> .....	40
3.5.1. Extração e purificação do DNA genômico.....	40
3.5.2. Reação em Cadeia pela Polimerase.....	41
3.5.3. Sequenciamento.....	43
3.6. Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos.....	44
3.7. Preservação dos isolados.....	46
3.8. Construção das bibliotecas gênicas.....	46
3.8.1. Extração do DNA genômico.....	46
3.8.2. Reação em Cadeia pela Polimerase com DNA metagenômico.....	47
3.8.3. Clonagem dos produtos de PCR.....	47

3.8.4. Preparo das células competentes de <i>Escherichia coli</i> .....	49
3.8.5. Transformação das células competentes por eletroporação.....	49
3.8.6. Seleção de clones transformantes.....	50
3.8.7. Mini-Preparação (extração do DNA plasmidial).....	50
3.8.8. Sequenciamento dos clones.....	51
3.8.8.1. Preparo das amostras para sequenciamento.....	51
3.8.8.2. Purificação e precipitação da reação de sequenciamento.....	51
3.9. Análise de resultados.....	52
3.9.1. Análise das sequências do gene 16S rRNA.....	52
3.9.2. Análise filogenética e Índices de Diversidade.....	53
3.9.3. Números de acesso das sequências de nucleotídeos.....	53
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
4.1. Dosagem dos parâmetros físicos e químicos.....	54
4.2. Identificação fenotípica de <i>P. aeruginosa</i> .....	55
4.3. Identificação molecular de <i>P. aeruginosa</i> .....	57
4.4. Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos.....	60
4.5. Análise das sequências.....	68
4.6. Análise de diversidade e filogenia.....	68
4.6.1. Árvore filogenética.....	70
4.7. Análise estatística.....	72
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO A - MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO B - PROVAS BIOQUÍMICAS.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO C - MÉTODO DE PRESERVAÇÃO.....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO D - PREPARO DE GÉIS, SOLUÇÕES E TAMPÕES.....</b>	<b>111</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Vigilância Sanitária é definida pela Lei Orgânica da Saúde como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” (BRASIL, 1990). Dentro desta definição destacamos as ações que se referem às condições e padrões de lançamento de efluentes de serviços de saúde, recentemente atualizadas no Parecer Técnico nº 003/2011 do departamento de Vigilância Sanitária em Saúde Ambiental, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). As considerações deste Parecer reforçam a importância da Vigilância Sanitária no controle das infecções hospitalares, e em continuidade a isto, sua interferência na preservação do meio ambiente no tocante à manutenção da qualidade dos recursos hídricos.

O “conjunto de ações” denota que a vigilância sanitária engloba um leque de atividades diversificadas, complexas, de natureza preventiva, que devem ser executadas de maneira articulada, ordenada e sempre voltadas para a racionalidade da eliminação, controle ou prevenção de riscos sanitários que possam vir a provocar danos à saúde de consumidores de produtos e serviços de interesse da saúde, bem como dos ambientes.

O uso da expressão “eliminar, diminuir ou prevenir” demonstra forte conotação relacionada ao poder de polícia da Vigilância Sanitária ao estabelecer proibições e restrições. Entretanto, o fato de “intervir nos problemas” demonstra o papel social e interventor que o Estado deve apresentar, sendo responsável pela proteção da saúde da população, à medida que desenvolve ações que controlem os riscos sanitários causadores de danos e agravos à saúde (SHUQAIR, 1996).

A realização deste estudo está fundamentada na necessidade de atender à legislação vigente no Brasil, em relação ao descarte de resíduos líquidos dos serviços de saúde e no estabelecimento da relação entre a Vigilância Ambiental e a Saúde Pública.

## 1.1. Legislação

No contexto da legislação, órgãos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) têm assumido o papel de orientar, definir regras e regular a conduta dos diferentes agentes, no que se refere à geração e ao manejo dos Resíduos de Serviços de Saúde (RSS), com o objetivo de preservar a saúde e o meio ambiente, garantindo a sua sustentabilidade. Este esforço se reflete, na atualidade, nas publicações da RDC ANVISA nº 306/04 (BRASIL, 2004), que destaca o item 13.3.1 do Anexo: *“Os resíduos líquidos provenientes de esgoto e de águas servidas de estabelecimento de saúde devem ser tratados antes do lançamento na rede coletora de esgoto...”* e nas publicações da Resolução CONAMA nº 358/05 (CONAMA, 2005) que destaca o Art. 8: *“Os efluentes líquidos provenientes dos estabelecimentos prestadores de serviços de saúde, para serem lançados na rede pública de esgoto ou em corpo receptor, devem atender às diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes.”*

No Rio de Janeiro, existe programa criado para atender a Lei nº 2.661, de 27/12/1996 (RIO DE JANEIRO, 1996) que determina níveis mínimos de tratamento de esgotos sanitários, antes de seu lançamento em corpos d'água, administrado pela Subsecretaria de Águas Municipais (Rio-Águas) e a Secretaria Municipal de Saúde. O Art. 8 destaca - *“Os efluentes de hospitais, laboratórios, clínicas e estabelecimentos similares, em áreas que não disponham de sistema público de tratamento, deverão sofrer tratamento especial na origem, que impossibilite a contaminação dos corpos receptores por organismos patogênicos”*. E o seu parágrafo 2º - *“Cabe aos hospitais, laboratórios, clínicas ou estabelecimentos similares a responsabilidade técnica e econômica pelo projeto, construção e operação das instalações de tratamento necessárias ao cumprimento do disposto no caput”*. A iniciativa impede que os resíduos hospitalares sejam jogados sem tratamento nos rios e lagoas da cidade, o que compromete a saúde pública e desrespeita as leis ambientais.

É importante esclarecer que, a Resolução CONAMA nº 357/2005 (CONAMA, 2005), dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. O Art. 24 destaca: *“Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis.”* E o parágrafo 1º do Art. 34 destaca:

*“O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.”*

## **1.2. Resíduos de Serviços de Saúde**

Os RSS são aqueles gerados em hospitais, clínicas, ambulatórios e similares e são definidos como “todos resíduos resultantes de atividades exercidas nos serviços de atendimento à saúde humana ou animal,...dentre outros similares”, segundo o CONAMA (CONAMA, 2005) e a ANVISA (BRASIL, 2004). Apresentam como principal característica o potencial de estarem contaminados com agentes patogênicos (ABNT, 1989). Eles representam em torno de 1% da quantidade total dos resíduos gerados no país e têm um papel importante no cenário da saúde pública por ser fonte potencial de organismos patogênicos, pelo caráter infectante de alguns de seus componentes e pela heterogeneidade de sua composição, que pode conter também substâncias tóxicas, radioativas, perfurantes e cortantes (SILVA, 2005).

A geração de resíduos pelas diversas atividades humanas constitui-se atualmente em um grande problema a ser enfrentado pelas administrações municipais, sobretudo nos grandes centros urbanos (BRASIL, 2006). Os RSS, por caracterizarem um desequilíbrio de caráter epidemiológico, com potencial de infecção altamente conhecido, tornaram-se um assunto de interesse mundial no impacto ambiental gradativamente acumulado (SOUZA, 2006). Armond & Amaral (2001) referem à estimativa da Associação Paulista de Estudos de Controle de Infecção Hospitalar, na qual 10% dos casos mais comuns de ocorrência de infecção hospitalar têm origem na contaminação pelos RSS.

O ambiente hospitalar é alvo de preocupação por parte da sociedade devido ao grande número de doentes em um mesmo local e pela diversidade de micro-organismos encontrados, que estariam presentes também nos resíduos gerados (COELHO, 2001).

Entre os diversos tipos de RSS, destacamos o esgoto hospitalar, que embora represente uma pequena parcela dos resíduos totais, ocupa uma posição de extrema importância pela capacidade que possuem de infectar e contaminar o meio ambiente, impactar a saúde humana e gerar implicações na saúde pública. Os problemas associados a esses resíduos líquidos hospitalares transcendem o campo técnico-sanitário e envolvem aspectos sociais, econômicos, políticos e ambientais, entre outros (LA ROSA, 2000).

### 1.2.1. Efluente hospitalar

Efluentes hospitalares caracterizam-se como possíveis veículos de disseminação de inúmeros micro-organismos patogênicos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos, que ocasionam muitas doenças com implicações em saúde pública (VECCHIA *et al.*, 2009). Além disso, os hospitais liberam, em seu esgoto, uma variedade de substâncias tais como fármacos, antibióticos, desinfetantes, anestésicos, metais pesados e drogas metabolizadas por pacientes (EMMANUEL *et al.*, 2005). Cerca de 30 a 60% dos medicamentos prescritos pela clínica médica são excretados no efluente hospitalar (MCQUILLIAN *et al.*, 2002). A disposição conjunta dos resíduos contendo micro-organismos e substâncias químicas pode provocar um aumento das populações bacterianas resistentes a certos antibióticos, detectadas no esgoto de hospitais (KÜMMERER, 2003). Portanto, os efluentes hospitalares, quando não tratados, possibilitam a contaminação de mananciais de água potável, tanto superficiais quanto subterrâneos (FORMAGGIA, 1994).

Uma importante consideração, no que concerne a efluentes hospitalares, é a avaliação do porte do hospital, pois baseado no número de leitos, pode-se estimar o volume de contribuição aos esgotos. Outro fator importante é o tipo de especialidade do hospital, pois enquanto o número de leitos oferece uma idéia de quantidade, a especialidade fornece a dimensão qualitativa das características do esgoto (GUILHERM, 1993).

A presença de micro-organismos resistentes em efluentes hospitalares é preocupante quando se avalia o potencial de risco relacionado à disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos (PRADO *et al.*, 2008). Os genes que conferem resistência aos antimicrobianos mediados por plasmídeos ou por outros elementos genéticos móveis podem ser transferidos para outras bactérias, principalmente através do processo de conjugação. Eles podem ser transferidos facilmente para outras espécies bacterianas principalmente em ambientes que exercem uma forte pressão seletiva (HEUER *et al.*, 2002; TENNSTEDT *et al.*, 2003). Quintera & Peixe (2006) detectaram genes de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de fonte não hospitalar, sugerindo que os mesmos são provavelmente de origem nosocomial. Assim, o esgoto deve ser considerado como uma fonte relevante de espécies bacterianas com diferentes perfis de resistência e possui um grande potencial para contaminação de rios e águas costeiras quando não tratado devidamente.

Em muitos casos, os patógenos encontrados no meio ambiente são os mesmos agentes etiológicos multirresistentes, das infecções hospitalares. Esse cenário mostra claramente a necessidade do desenvolvimento de um sistema rápido, sensível e abrangente do monitoramento da ocorrência desses patógenos em ambientes naturais (impactados ou não), em contato direto ou indireto com a população. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são micro-organismos de grande interesse por estarem geralmente envolvidos na infecção hospitalar (GARCIA & ZANETTI-RAMOS, 2004). Bidone (2001) ressalta que esses micro-organismos são os mais frequentemente encontrados em análises microbiológicas dos resíduos de serviços de saúde.

Uma avaliação de efluentes do Complexo Universitário Hospitalar de Limoges demonstrou que, embora a contagem total de micro-organismos deste efluente seja menor do que a observada em esgotos domésticos, estes são, em geral, multirresistentes (LEPRAT, 1999). A presença destas linhagens pode representar um grande risco à saúde pública se atingirem o sistema de abastecimento (DREMONT & HADJALI, 1997). Estas observações têm uma importância epidemiológica relevante e destacam o papel da água, em especial das residuárias, na circulação de micro-organismos resistentes no meio ambiente.

### 1.3. Gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família Pseudomonadaceae, que envolve um grande grupo de espécies de bacilos Gram negativos, retos ou ligeiramente curvos, com aproximadamente 1,5 a 3,0 $\mu$ m de comprimento e 0,5 a 1,0 $\mu$ m de largura, móveis, estritamente aeróbios e não formadores de esporos. Podem ser encontrados na água, no solo, no esgoto e no ar e produzem pigmentos solúveis na água. Crescem bem em temperaturas que variam de 25°C a 37°C (DAVIS *et al.*, 1973; POLLACK, 1995; SILVA, 1999; POLLACK, 2000). O potencial de hidrogênio (pH) para cultivo varia entre 5,6 e 8,0, sendo considerado como ótimo quando entre 6,6 e 7,0 (TODAR, 2002). É um grupo extremamente heterogêneo que foi reclassificado várias vezes com base em características fenotípicas (SNEATH *et al.*, 1981), hibridização DNA-DNA (PALLERONI, 1984), similaridade de sequência do gene 16S rRNA (ANZAI *et al.* 2000) e os dados quimiotaxonômicos (OYAIZU & KOMAGATA, 1983; VANCANNEYT *et al.*, 1996). Seus membros anteriormente agrupados nas subclasses  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\gamma$  das Proteobactérias (PALLERONI, 1984), mas agora estão restritos à subclasse  $\gamma$ , e tem a *P. aeruginosa* como a espécie tipo, os membros das subclasses  $\alpha$  e  $\beta$  foram transferidos para outros gêneros (KERSTERS *et al.*, 1996; ANZAI *et al.*, 2000).

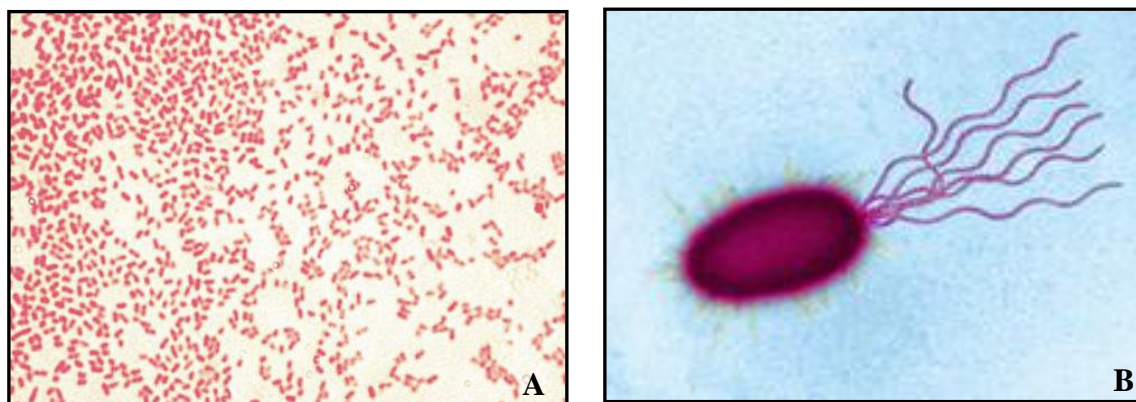
Membros do gênero *Pseudomonas* são ubíquos na natureza devido à sua versatilidade metabólica (PALLERONI, 1993; ELKIN & GEDDES, 2003; LÓPEZ- ROMALDE *et al.*, 2003; LEVITSKI-HEIKKILA & ULLIAN, 2005). Um grande número de espécies de *Pseudomonas* é conhecido por usar uma variedade de xenobióticos como fontes de carbono e energia (KIYOHARA *et al.*, 1992, JOHNSEN *et al.*, 1996, STOLZ *et al.*, 2007) e assim são exploradas para a biorremediação de tais compostos (O'MAHONY *et al.*, 2006; ONACA *et al.*, 2007). Devido ao seu sucesso na biorremediação de solos contaminados com óleo (LAL & KHANNA, 1996; MISHRA *et al.*, 1999, WHYTE *et al.*, 2001), tem havido um grande número de tentativas de isolar *Pseudomonas* a partir desses ambientes (BHATTACHARYA *et al.*, 2003; PRAKASH *et al.*, 2007).



### 1.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* é o mais importante patógeno humano no gênero *Pseudomonas* (Figura 1A e 1B)(PAVIANI *et al.*, 2004).

A habilidade de crescer a 42°C a diferencia de muitas outras espécies de *Pseudomonas* (SILVA, 1999).



**Figura 1.** Morfologia e estrutura da *Pseudomonas aeruginosa*. (A) Coloração de Gram - bacilos Gram negativos (Dennis Kunkel Microscopy, Inc.); (B) Ilustração da célula com flagelos (Dennis Kunkel Microscopy, Inc.)

Algumas cepas de *P. aeruginosa* produzem de um a quatro pigmentos diferentes, sendo os mais comuns, pioverdina (pigmento fluorescente) e piocianina (pigmento de cor azul), responsáveis pela cor verde brilhante característica das colônias de *P. aeruginosa*. Algumas cepas produzem também outros pigmentos hidrossolúveis como piorrubina (avermelhado) ou piomelanina (marrom a preto). Possuem a característica de emissão de odor de fruta adocicado e formação de colônias com diversos aspectos morfológicos, podendo ser diminutas ou até planas, difusas ou mucóides com bordos serrados e brilho metálico (GILLARDI, 1980; VASIL, 1986; VISCA *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1999; REIS, 2003). O odor adocicado de frutas, semelhante a uvas, é o produto de uma aminocetona liberado pelo micro-organismo (TRABULSI & ALTERTHUN, 2004).

São bactérias “não fermentadoras”, ou seja, obtém sua energia pelos processos de oxidação de carboidratos ao invés de fermentação. O seu envoltório é semelhante à de outros bacilos Gram negativos e sua membrana externa é composta por proteínas, fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS) (SILVA *et al.*, 1999; REIS, 2003).

A *P. aeruginosa* apresenta as seguintes características bioquímicas que podem ser avaliadas na sua identificação: oxidase positiva,  $\beta$ -hemólise em ágar sangue, motilidade positiva, crescimento à 42°C, redução de nitrato a nitrito, lisina descarboxilase negativo, acetamida positivo, malonato positivo, citrato positivo, indol negativo, formação de ácido oxidativamente a partir da glicose e do manitol, incapacidade de oxidar maltose e lactose, DNase negativo e sensibilidade à polimixina B (HUGH & LEIFSON, 1953). Uma característica importante é a formação em meio de cultura líquido e sólido, de uma camada de aspecto mucóide denominada *slime*, que é uma característica importante na formação de biofilmes (TRABULSI & ALTERTHUN, 2004).

A *P. aeruginosa* é um dos principais micro-organismos recuperados de efluentes hospitalares. É um patógeno nosocomial frequente, responsável por infecções em diversos sítios do corpo humano, particularmente em pacientes imunocomprometidos (GALES *et al.*, 2001). Produz várias exotoxinas que respondem por boa parte de sua patogenicidade. Infecções ocasionadas por estes patógenos estão frequentemente associadas com a alta mortalidade (ARAKAWA *et al.*, 2000; POIREL *et al.*, 2000; LIVERMORE, 2002; PELLEGRINO *et al.*, 2002; PITOUT *et al.*, 2005).

Infecção causada por este agente tem sido particularmente desafiante tendo em vista que o perfil de susceptibilidade deste patógeno vem se modificando com o passar dos tempos em consequência à pressão seletiva existente no meio ambiente hospitalar, sobretudo nas unidades de terapia intensiva. Tais condições fazem com que este micro-organismo se adapte às condições ambientais a que está continuamente exposto, desenvolvendo novos mecanismos de resistência. Estas modificações fenotípicas podem ser responsáveis pelo agravamento do estado clínico, aumento do tempo de hospitalização e encarecimento do tratamento por haver necessidade de mais exames complementares, do uso de drogas cada vez mais potentes, tóxicas e caras (JARVIS, 1987; MARRA, 2002; MARTINS, 2002; NOUÉR *et al.*, 2005; PITOUT *et al.*, 2005).

A resistência a agentes antimicrobianos contribui para o importante papel da *P. aeruginosa* como um patógeno oportunista, contribuindo para o aumento da prevalência de infecções hospitalares (SADER *et al.*, 2001; LIVERMORE, 2002; SANTOS *et al.*, 2002; REIS, 2003; SARDELIC *et al.*, 2003; LAGATOLLA *et al.*, 2004).

Embora a resistência a multidrogas seja frequentemente atribuída à associação de diversos mecanismos de resistência, pesquisas indicam que a presença de bombas de efluxo pode exercer um papel crítico na resistência antibiótica da *P. aeruginosa* e outras bactérias Gram negativas (AESCHLIMANN, 2003).

A *P. aeruginosa* muitas vezes se desenvolve em biofilmes densos, contribuindo para sua identificação frequente como a causa de infecções nosocomiais em tubos ou outros dispositivos médicos invasivos (TORTORA *et al.*, 2005). Os biofilmes bacterianos são comunidades estruturadas de células aderidas a um substrato biótico ou não, inseridas em uma matriz polimérica produzida pelas próprias bactérias (COSTERTON *et al.*, 1999).

Esta distribuição universal sugere um notável grau de adaptabilidade fisiológica e genética (SPIERS *et al.*, 2000). Este fator contribuiu para a determinação das espécies do gênero *Pseudomonas* como bons bioindicadores na avaliação da diversidade bacteriana em inúmeros sítios, incluindo a qualidade dos recursos hídricos, por métodos de cultivo ou aqueles baseados somente nas sequências do DNA (metagenômica) (LEE *et al.*, 2007). Esta abordagem representa uma importante ferramenta na avaliação da qualidade de diversos ambientes, inclusive os aquáticos, ou seja, na condição de “saúde” de uma área, definida pela determinação e monitoramento das comunidades microbianas encontradas diretamente nos recursos hídricos.

#### 1.4. Parâmetros físicos e químicos

Um dos principais parâmetros utilizados nas análises físico-química do efluente hospitalar é a avaliação do potencial hidrogeniônico. A condição ácida ou básica da água refere-se à concentração de íons de hidrogênio ( $H^+$ ) em uma solução. Condições muito ácidas ou muito básicas da água afetam o desenvolvimento dos organismos nela contidos (COSTA *et al.*, 2003). A condutividade é a medida da habilidade de uma solução aquosa, para transportar uma corrente elétrica. Esta habilidade é indicada pela presença de sais, pois quanto maior a concentração total, e a valência desses íons, maior será a condutividade elétrica (COSTA *et al.*, 2003). Outro parâmetro relevante é a turbidez que reflete a redução da transparência da água devido à presença de partículas sólidas em suspensão, que diminuem a claridade e reduzem a transmissão da luz no meio. Ela pode reduzir a eficiência da cloração, pela proteção física dos micro-organismos do contato direto com os desinfetantes, além de transportar matéria orgânica absorvida que pode provocar alteração de sabor e odor. A turbidez pode ser avaliada numa escala de 0 a 1000 UNT (SANTOS *et al.*, 1999). O oxigênio dissolvido (OD) é fundamental para a sobrevivência dos organismos aeróbios presentes em ambientes aquáticos. Durante o processo de biodegradação e consumo da matéria orgânica, as bactérias fazem uso do oxigênio nos seus processos respiratórios, podendo causar uma redução acentuada da sua concentração no meio. A análise de OD é um importante teste para águas poluídas e para águas em processo de tratamento; ambientes pobres em oxigênio e ricos em matéria orgânica são propensos a proliferação de micro-organismos anaeróbios (COSTA *et al.*, 2003). A temperatura é um parâmetro importante a ser analisado, pois está diretamente relacionado com o metabolismo dos micro-organismos. É importante o seu controle porque elevações da temperatura aumentam a taxa metabólica, aceleram o processo de biodegradação da matéria orgânica, a assimilação de nutrientes e o consumo do oxigênio dissolvido do corpo aquático, diminuem a solubilidade dos gases (exemplo: oxigênio dissolvido) e aumentam a taxa de transferência de gases, o que pode causar odor desagradável (APHA, 2005; VON SPERLING, 2005). A salinidade que é a medida dos teores de sais na água, também é um fator importante porque interfere diretamente no desenvolvimento microbiano (ESTEVES, 1988).

### 1.5. Situação atual na América Latina e no Brasil

Na América Latina, o Programa de Vigilância Epidemiológica e de Resistência Antimicrobiana (SENTRY), fornece dados sobre a ocorrência de *P. aeruginosa* em infecções hospitalares, tendo sido este o micro-organismo mais frequentemente detectado entre os patógenos bacterianos de pacientes com pneumonia, internados em 10 centros médicos de seis países da América Latina (SADER *et al.*, 2001). O SENTRY reportou, no tocante à sensibilidade antimicrobiana, uma reduzida sensibilidade à ceftazidima (59,5%). Quanto às fluoroquinonas apenas 50 a 60% das amostras se mostraram sensíveis, assim como para os aminoglicosídeos. Além disso, 62,1 % dos isolados foram sensíveis à amicacina e 55%, à gentamicina (TRABULSI & ALTERTHUN, 2004).

Frequentemente, isolados de *P. aeruginosa* apresentam um amplo espectro de resistência, podendo ser resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos, inclusive contra cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos (como imipenem e meropenem). Por estas razões, as infecções causadas por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes estabelecem um substancial desafio para a terapia antimicrobiana, trazendo ao cenário atual a inevitável necessidade de identificar essas bactérias multirresistentes no efluente hospitalar e avaliar sua contribuição para a disseminação da resistência em amostras de água superficial (FUENTEFRÍA *et al.*, 2008).

No Brasil, encontram-se publicados alguns trabalhos envolvendo a avaliação de efluentes hospitalares. Fuentefría e colaboradores (2008) realizaram um estudo cujo objetivo foi comparar amostras de efluente do Hospital São Vicente de Paulo, em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, com amostras de água do rio Passo Fundo, quanto ao perfil de susceptibilidade de isolados de *P. aeruginosa*, para inferir sobre a presença de isolados de origem hospitalar em amostras de água superficial. Foi verificada a presença de linhagens resistentes no rio, receptor desses resíduos líquidos, indicando a presença de contaminação com bactérias provenientes de um ambiente sob forte pressão seletiva, como é o ambiente hospitalar. Um estudo para verificar a eficácia da planta de tratamento de esgoto de um hospital do Rio de Janeiro demonstrou a presença de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes no efluente tratado, permitindo assim a disseminação dessas bactérias para o meio ambiente (PRADO *et al.*, 2008). Recentemente, uma avaliação microbiológica na estação de tratamento de esgoto do complexo hospitalar Lourenço Jorge/Maternidade Leila Diniz, no Rio de Janeiro, revelou a presença de linhagens de

*P. aeruginosa* em todas as etapas do tratamento, inclusive naquela submetida ao tratamento químico (solução de hipoclorito de sódio) (NOVAES, 2008). Resende e colaboradores (2009) isolaram *E.coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, em efluentes de esgoto de 10 hospitais situados em Goiânia e da estação de tratamento de esgoto da cidade, para determinar seu perfil de susceptibilidade e investigar seus mecanismos de resistência.

A comissão parlamentar de inquérito da saúde da Câmara de vereadores da cidade do Rio de Janeiro constatou que o esgoto produzido por diversos hospitais da cidade é despejado no mar, tanto na Baía de Guanabara como pelo emissário de Ipanema. De acordo com o estudo, pelo menos 101 dos 420 hospitais existentes na cidade não têm estação de tratamento e, destes, 69 despejam seus resíduos líquidos no mar. Vinte e quatro hospitais encaminham seu esgoto para estações da Companhia Estadual de Águas e Esgotos (CEDAE), de onde ele é descartado pelo emissário de Ipanema. Pesquisadores afirmam que o tratamento dado ao esgoto não é suficiente para matar bactérias, vírus e parasitas, o que simplesmente colocaria sob risco as praias do Rio de Janeiro (Ipanema, Leblon e Arpoador), que poderiam estar contaminadas pelo esgoto despejado por 28 hospitais. Embora o emissário lance os resíduos a 4,35 km da praia, com tratamento por dispersão, pesquisadores afirmam que há chance de os dejetos com bactérias e vírus voltarem à praia sob determinadas condições de vento, maré e correntes. Além disso, o sistema de dispersão também é criticado, pois alguns vírus e bactérias são resistentes na água salgada. Na Baía de Guanabara, a situação constatada é ainda pior, pois ela recebe o esgoto de 41 hospitais sem nenhum tratamento (ABESSA, 2002).

Vecchia e colaboradores (2009), através de um trabalho conduzido por inquérito eletrônico, constataram que dos 127 hospitais brasileiros (com mais de 200 leitos, conforme o sistema DATASUS) escolhidos para participar da pesquisa sobre a existência ou não de tratamento de esgoto nessas instituições, somente oito se dispuseram a participar e apenas três destes são dotados atualmente de uma estação própria de tratamento de esgoto.

Segundo estudo realizado pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente (SMAC) existe 420 unidades de saúde em toda a cidade do Rio de Janeiro. Destas, 361 foram vistoriadas e 197 tiveram seu efluente analisado. O resultado encontrado revela que 148 unidades de saúde não possuem estação de tratamento de esgoto e dentre elas 83 também não apresentam tratamento final no destino de seu efluente. Este estudo ainda verificou que 40 unidades de saúde têm seu efluente contaminado por *P. aeruginosa*, oriundo de fezes e sangue de pacientes contaminados (DIÁRIO OFICIAL DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, 2002).

## 1.6. Metagenômica

Durante os últimos 50 anos, até o advento da biologia molecular e de técnicas da genética e de bioinformática, o estudo de micro-organismos era feito exclusivamente pela fisiologia, morfologia e bioquímica de organismos cultiváveis em meios de cultura, limitada ao estudo das espécies capazes de crescer em um meio artificial de cultura gerado no ambiente laboratorial. Através dessas técnicas, os micro-organismos podem ser estudados individualmente. Entretanto essa abordagem limita a avaliação taxonômica, filogenética e a estimativa da diversidade microbiana da biosfera, porque apenas uma pequena parcela dos micro-organismos, em torno de 1%, são cultiváveis em laboratório pelas condições laboratoriais conhecidas. Acredita-se que grande parte dos micro-organismos cultivados são muito diferentes evolutivamente daqueles já identificados (PACE, 1997). Desta forma, foram desenvolvidos métodos independentes de cultivo, sendo o principal deles a metagenômica, que possibilitaram acessar e conhecer melhor a diversidade genética, a estrutura das populações e as funções ecológicas dos micro-organismos (RIESENFELD *et al.*, 2004).

O termo metagenoma foi proposto em 1998 por Handelsman e colaboradores. A metagenômica pode ser definida como a análise funcional das sequências nucleotídicas da coletividade de genomas microbianos (metagenoma) existentes em uma determinada amostra ambiental (HANDELSMAN *et al.*, 1998).

A abordagem metagenômica elimina a etapa de cultivo, pois consiste na extração direta do ácido desoxirribonucléico (DNA) do ambiente seguida de clonagem ou sequenciamento direto por pirosequenciamento. Isolar o DNA de uma amostra ambiental é a primeira e a mais importante etapa para montar uma biblioteca metagenômica sendo que a qualidade da análise metagenômica é diretamente relacionada com a qualidade do DNA isolado (GREEN & KELLER, 2006). Após, é realizada a ligação (fragmento de DNA inserido no vetor de clonagem), e posteriormente o DNA recombinante vetor-inserto é introduzido em um hospedeiro cultivável (transformação) para a análise funcional dos genes e para determinação de sua sequência (HANDELSMAN, 2004). Essa abordagem permite a construção de uma biblioteca metagenômica com este genoma misto (Figura 2). Essa estratégia permite o acesso a genes de bactérias não cultivadas de inúmeros ambientes (PACE, 1997).

Atualmente, existe uma discrepância entre a diversidade microbiana presente em amostras ambientais quando acessadas pela contagem das células viáveis, pela contagem por microscópio de

epifluorescência e através de análises filogenéticas a partir das sequências do gene 16S rRNA. Essa discrepância pode ser atribuída ao desconhecimento das condições fisiológicas ou das formas das bactérias presentes no ambiente. Como os micro-organismos estão presentes tanto na forma ativa como na forma dormente, acredita-se que a proporção de células viáveis contadas diretamente reflete a proporção entre o número de células ativas e células quiescentes (HATTORI *et al.*, 1997).

O advento da metagenômica que vem proporcionando a realização de análises de comunidades microbianas em inúmeros ambientes baseada em sequência é o *screening* de genes de interesse baseando-se em suas sequências conservadas (AMANN *et al.*, 1995; PACE, 1997; RIESENFELD *et al.*, 2004; COWAN *et al.*, 2005). Esta análise é efetiva para identificação de âncoras filogenéticas e genes de enzimas com domínios altamente conservados (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003).

A facilidade de acesso ao conteúdo total genético trouxe várias abordagens de estudo para metagenômica. A princípio, o foco principal da metagenômica foi uma melhor compreensão da biodiversidade através da análise de DNA de amostras ambientais (DUPRÉ & O'MALLEY, 2007). A clonagem e o sequenciamento do gene 16S rRNA, usado desde os primórdios da microbiologia molecular, a partir do DNA extraído diretamente de amostras ambientais como solo, águas dos oceanos e biofilmes contribuíram para um entendimento mais aprofundado da diversidade e da função das comunidades bacterianas destes ambientes (TRINGE *et al.*, 2005).



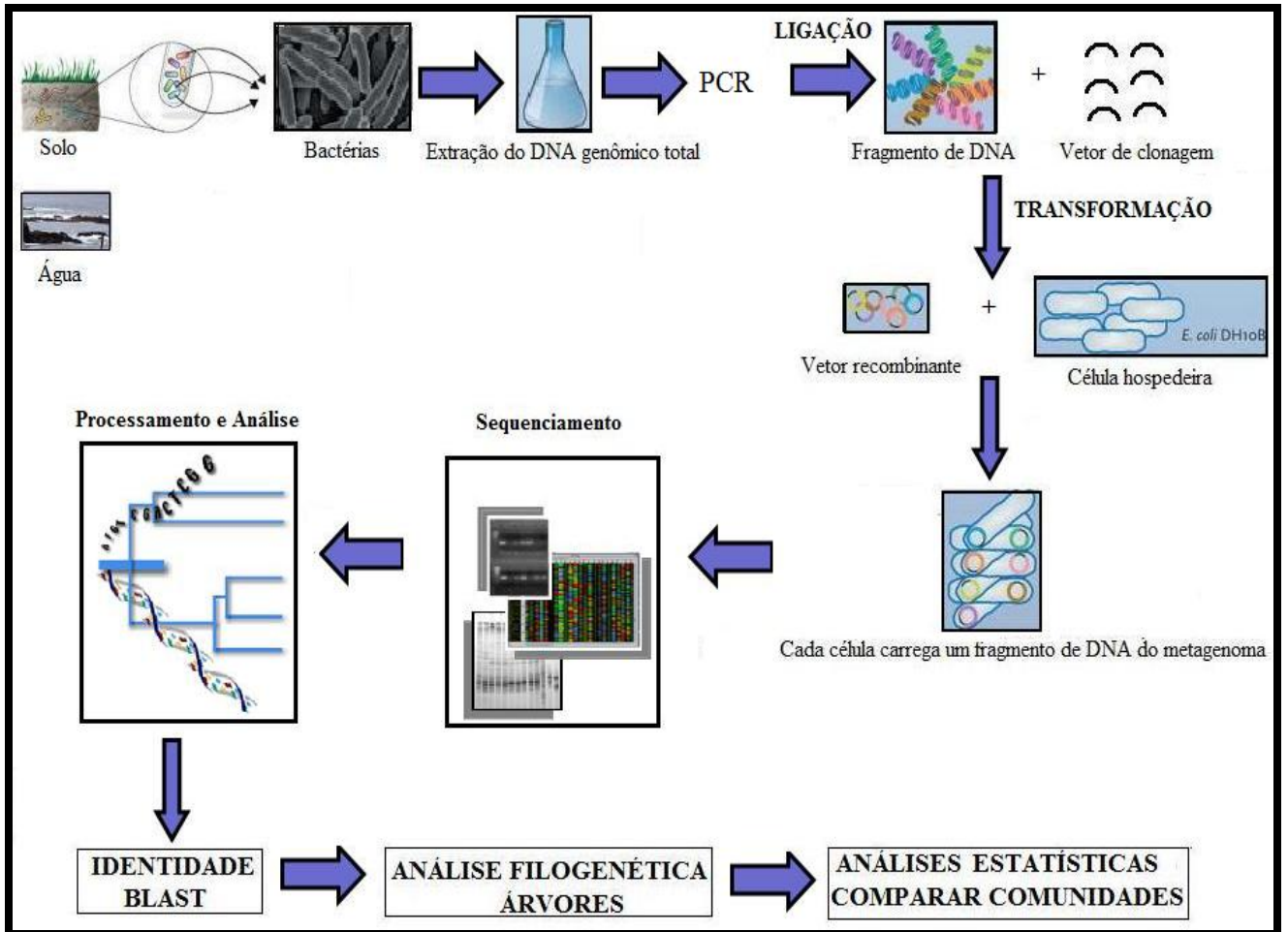


Figura 2. Esquema adaptado das etapas da metagenômica (HANDELSMAN, 2005)

## 1.7. O gene 16S rRNA como marcador molecular

Diversas ferramentas genéticas estão sendo usadas para caracterizar comunidades microbianas de vários ambientes sem a necessidade de cultivo (KOWALCHUK *et al.*, 2004), entre elas, o sequenciamento do gene 16S rRNA.

Os ácidos ribonucléicos (RNA) que compõem os ribossomos (rRNA) estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente de todos os sistemas de vida (ATLAS & BARTHA, 1998). As subunidades do ribossomo são similares em procariotos e eucariotos e a unidade usada para medir os ribossomos é a Svedberg (S) que mede a velocidade de sedimentação na centrifugação e não o tamanho. Os Procariotos têm ribossomos 70S, constituídos de uma unidade 30S (16S RNA e 21 proteínas) e outra 50S (5S RNA, 23S RNA e 34 proteínas). Os Eucariotos têm ribossomos 80S, constituídos de uma unidade 40S (18S RNA e 33 proteínas) e uma 60S (28S RNA, 5,8 S RNA e aproximadamente 49 proteínas).

Baseado na diferença entre os tamanhos, os genes do RNA dos procariotos foram denominados de subunidade menor para o 16S rRNA, e subunidade maior para o 23S rRNA (HURST *et al.*, 2002). O gene 16S rRNA é composto por um conjunto de aproximadamente 1550 nucleotídeos. Certos atributos deste gene podem favorecê-lo como cronômetro molecular (WOESE *et al.*, 1983). As sequências do 16S rRNA são dotadas de regiões altamente conservadas (WOESE, 1987). No entanto, após o início das análises de sequenciamento esse gene foi subdividido em 9 regiões (V1-V9) de acordo com a presença de maior ou menor variação de nucleotídeos (DAMS *et al.*, 1988).

Estas regiões variáveis são utilizadas para determinação de filogenia entre os procariotos (WOESE *et al.*, 1983). A acurácia da inferência filogenética é dependente não somente do número de bases comparadas, mas também das regiões da molécula que são comparadas (HURST *et al.*, 2002). Com base nestes conhecimentos, o gene 16S rRNA vem sendo amplamente utilizado na elucidação da diversidade e filogenia dos micro-organismos. Este marcador é tão seguro e aceito pela comunidade científica que um banco de dados curado do gene 16S rRNA, o Ribosomal Database Project (RDP) foi criado e encontra-se disponível para pesquisa e consulta. Com isso, o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA representa uma importante ferramenta para análise de diversidade de comunidades bacterianas em amostras ambientais. O uso desta técnica tem demonstrado ótimos resultados no âmbito de estimar e comparar comunidades bacterianas de diferentes ambientes (KUSKE *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2006;

CLEMENTINO *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2007; CLEMENTINO *et al.*, 2008; VAL-MORAES *et al.*, 2009; TURQUE *et al.*, 2010).

### **1.8. Estação de Tratamento de Esgoto do Complexo hospitalar Lourenço Jorge / Leila Diniz**

O Hospital Municipal Lourenço Jorge (HMLJ), localizado na Barra da Tijuca, Rio de Janeiro (22°59'42.01''S/43°21'51.28''O), possui 1288 funcionários SUS (médicos e outros) e 283 leitos, distribuídos entre os setores de cirurgia geral, buco maxilo facial e ortopediatraumatologia, clínica geral, neonatologia, AIDS, Unidade Intermediária, Unidade Isolamento, Unidade Intermediária neonatal, Unidade de Tratamento Intermediário neonatal, Unidade de Tratamento Intensivo adulto, obstetrícia cirúrgica, obstetrícia clínica, pediatria clínica, psiquiatria e fisiologia (ESTABELECIMENTO, 2011).

A maternidade Leila Diniz (MLD), também localizada na Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, possui 59 leitos, sendo 40 leitos obstétricos, 4 de enfermagem canguru, 10 de Unidade Intermediária neonatal, 5 de UTI neonatal, tendo capacidade de realizar entre 300 e 400 partos por mês (NOVA, 2008).

A ETE do complexo hospitalar Lourenço Jorge/Leila Diniz realiza o tratamento classificado como terciário, ou seja, além de realizar a fase primária e secundária, completa o tratamento com uma fase terciária que, no caso específico desta estação, se trata da adição de um produto químico (Figura 3).

Na fase de tratamento primário, os dejetos do complexo hospitalar Lourenço Jorge/Leila Diniz chegam por canalizações, passivamente por efeito gravitacional, à estação de tratamento e são direcionados a um poço situado abaixo do nível da edificação, onde ocorre a remoção dos sólidos grosseiros através de grades, para que sejam protegidas as demais unidades de tratamento, além dos dispositivos de transporte (bombas e tubulações) e os corpos receptores. Neste poço, cujas mensurações permitem o acesso das equipes de inspeção e operação da unidade, o afluente percorre por calhas (abertas), e por uma em especial, calha Parshall, onde a vazão do líquido é medida por períodos pré-determinados. Com o auxílio de bombas de recalque, a massa líquida é transferida para o tanque de aeração, onde é injetado, por um período pré-determinado, oxigênio em grande quantidade para que seja estimulada a multiplicação da microbiota bacteriana aeróbica, iniciando-se a fase de tratamento secundário.

Nessa fase há uma intensa multiplicação microbiana com a decomposição da matéria orgânica. A base de todo o processo biológico é o contato efetivo entre os micro-organismos aeróbios e o material orgânico contido nos efluentes, de tal forma que esse possa ser utilizado como alimento pelos micro-organismos. Eles convertem a matéria orgânica em gás carbônico, água e material celular.

Após a fase em que é feita a degradação biológica, os sólidos produzidos são depositados no fundo do tanque formando o lodo (lodo primário). A parte líquida é dirigida ao tanque de decantação e o sobrenadante flui vagarosamente pelos decantadores e destes, para o tanque de esgoto tratado. No fundo do tanque de decantação também há formação de um lodo que juntamente com o lodo primário, retorna ao tanque de aeração para mais uma vez refazer o ciclo e ter melhor rendimento do efluente. O retorno do lodo é necessário para suprir o tanque de aeração com uma quantidade suficiente de micro-organismos e manter uma relação alimento/micro-organismo capaz de decompor com maior eficiência o material orgânico.

O esgoto tratado é então encaminhado a um tanque de passagem de dimensões menores que os anteriores, localizado na área externa à estação onde é adicionado, por gotejamento, cloro líquido que é a fase terciária de tratamento. A quantidade do cloro é calculada de acordo com a vazão de saída do efluente e provém de uma “bomba dosadora de cloro”, instalada no núcleo central de operações da estação de tratamento. O efluente clorado é então incorporado à rede pluvial. O lodo resultante de todo o tratamento é estocado e retirado periodicamente por caminhões tanque, e encaminhado para a estação de tratamento de esgoto Alegria, Rio de Janeiro (NOVAES, 2008).

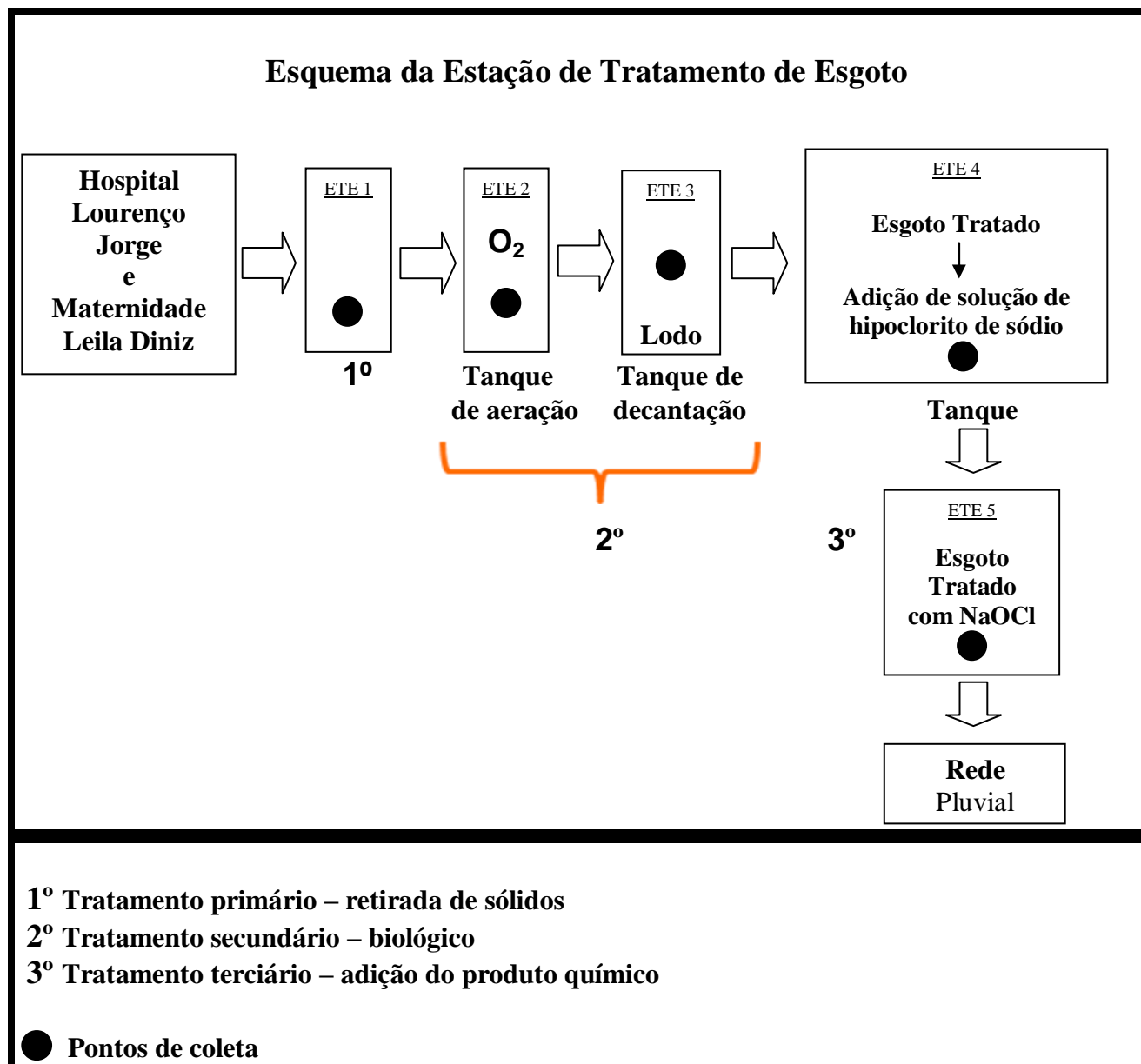


Figura 3. Esquema da estação de tratamento de esgoto do complexo hospitalar Lourenço Jorge/Leila Diniz

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliar a influência do tratamento do resíduo líquido hospitalar em isolados de *P. aeruginosa* e na diversidade de *Pseudomonas* spp. pela abordagem da metagenômica.

### 2.2. Específicos

- Caracterizar as cepas de *P. aeruginosa* isoladas dos 5 pontos de coleta, por métodos fenotípicos (provas bioquímicas e susceptibilidade aos antimicrobianos) e moleculares (amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA);
- Comparar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *P. aeruginosa* intrahospitalares e daquelas isoladas da ETE hospitalar;
- Determinar as comunidades de *Pseudomonas* spp. nos 5 pontos da ETE hospitalar, por meio da metagenômica - bibliotecas do gene 16S rRNA;
- Posicionar os clones de 16S rDNA no espaço filogenético através de ferramentas de bioinformática;
- Determinar as diferenças da composição das comunidades bacterianas analisadas através de métodos estatísticos.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Ambiente selecionado para o estudo

##### 3.1.1. Hospital Municipal Lourenço Jorge e Maternidade Leila Diniz, na Barra da Tijuca.

Os dois hospitais possuem um total de 302 leitos e realizam cerca de 30 mil atendimentos mensais. A estação atende às duas unidades e tem capacidade para tratar 220 mm<sup>3</sup> de esgoto por dia, evitando que o esgoto produzido pelo hospital seja despejado sem tratamento nos rios da região (Figura 4A e 4B).



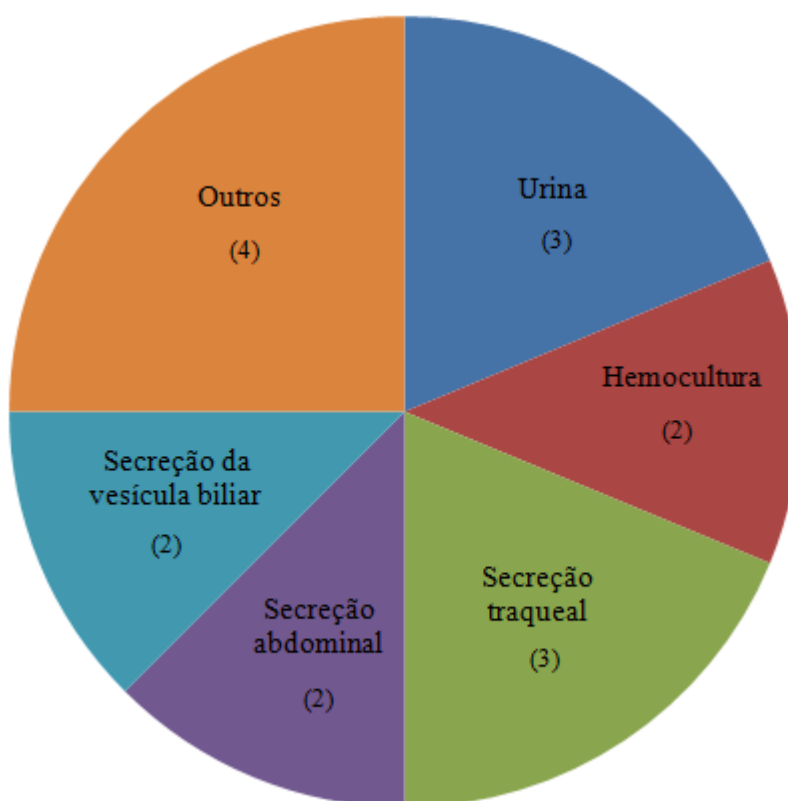
Figura 4 (A e B). Vista panorâmica da estação de tratamento de esgoto estudada

#### 3.2. Amostragem

**Amostras da ETE hospitalar** - Foram coletadas, em frascos estéreis, 5 amostras (500 mL de cada ponto) correspondentes aos pontos da estação de tratamento: amostra 1 – ETE 1 (chegada do esgoto a ETE); amostra 2 – ETE 2 (tanque de aeração); amostra 3 – ETE 3 (tanque de decantação); amostra 4 – ETE 4 (adição de hipoclorito de sódio ao esgoto) e amostra 5 – ETE 5 (saída do esgoto tratado e clorado da ETE). As amostras foram coletadas no período chuvoso da manhã do dia 25 de fevereiro de 2010. Após a obtenção das amostras, as mesmas foram armazenadas em recipientes estéreis, e conservadas dentro de uma caixa de isopor com gelo (recipiente isotérmico) até a estocagem no laboratório onde ocorreu o seu processamento.

**Amostras clínicas** – Durante o período entre 02/02/2010 e 10/03/2010, foram recolhidos 16 isolados de *P. aeruginosa*, provenientes de pacientes do Hospital Municipal Lourenço Jorge/RJ, obtidos a partir de diferentes espécimes clínicos, incluindo secreção da vesícula biliar, secreção traqueal, urina, hemocultura, secreção abdominal, e outras secreções biológicas nomeadamente: secreção do músculo do quadril, secreção de cimento ósseo, secreção de fragmento ósseo e partes moles do quadril (Gráfico 1). Estes isolados foram provenientes de pacientes de vários setores médicos do HMLJ.

Os isolados foram identificados no laboratório de microbiologia do hospital usando os tradicionais métodos bacteriológicos e exames bioquímicos, utilizando o cartão Vitek 2 GNI seguindo as recomendações do fabricante (bioMérieux). As amostras foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em glicerol 15% (v/v) em caldo nutriente.



**Gráfico 1.** Distribuição dos 16 isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de diversos setores médicos do HMLJ



### 3.3. Dosagem dos parâmetros físicos e químicos

As dosagens de pH, condutividade, turbidez, OD, temperatura e salinidade foram realizadas no momento da coleta com o equipamento Water Quality Checker U-10 (Horiba®) e a dosagem de cloro foi realizada com o medidor de cloro (Extech®) em todos os pontos de coleta.

### 3.4. Isolamento e Identificação fenotípica de *P. aeruginosa*

Utilizando-se uma pipeta estéril, foi transferido 1 mL da amostra coletada de cada ponto para um tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo nutriente (ANEXO A). Os tubos foram incubados na estufa a 37°C por 24 horas. Depois deste período, o tubo de ensaio correspondente a cada ponto da coleta, foi homogeneizado e transferiu-se 100 µL do caldo para uma placa de Petri contendo ágar ceftrimide (meio de cultura seletivo para *P. aeruginosa*). Foi utilizada alça de drigalski para distribuir o inóculo bacteriano sobre o meio de cultura. As placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas. As colônias isoladas do ágar ceftrimide foram submetidas à coloração de Gram, teste da catalase e oxidase e às provas bioquímicas convencionais: L-lisina dihidrolase, L-arginina, L-ornitina descarboxilase, hidrólise da gelatina, teste de oxidação-fermentação da glicose (OF glicose), meio SIM (Sulfeto/Indol/Mobilidade) e teste de crescimento em caldo nutriente a 42°C, de acordo com o Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (BUCHANAN & GIBBONS, 1974) (ANEXO B).

### 3.5. Identificação molecular de *P. aeruginosa*

#### 3.5.1. Extração e purificação do DNA genômico

As culturas puras obtidas no ágar ceftrimide foram submetidas à extração e purificação do DNA genômico segundo o protocolo para bactéria Gram negativa do kit *Dnaeasy® Blood & Tissue* (Qiagen®). Uma alça bacteriológica do crescimento bacteriano foi ressuspensa no tampão indicado e foi seguido todo o procedimento de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA genômico foi verificada em gel de agarose 1% (Sigma®) numa corrida eletroforética a 70 volts por 50 minutos, em tampão TBE 0,5X (ANEXO D) e com a inclusão de um padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder INVITROGEN®) no gel corado com brometo de etídio (10 mg/mL). A revelação do gel foi em um sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

### 3.5.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Foi realizada a confirmação das cepas de *P. aeruginosa* pela reação em cadeia pela polimerase. A mistura de cada reação totalizou 50 µL e foi composta pelos seguintes reagentes: 25 pmol dos iniciadores específicos para *P. aeruginosa* (PA-SS-F e PA-SS-R) (SPILKER *et al.*, 2004)(Tabela 1), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs - dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1U de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN®), solução-tampão da PCR 1X (20mM Tris-HCl-pH8.4, 50mM KCl), ~ 50ng do DNA da amostra e água deionizada estéril (INVITROGEN®). As cepas de referência *P. aeruginosa* INCQS: 00027/ATCC 29336 e *Escherichia coli* INCQS: 00031/ATCC 10536 foram empregadas para avaliar a especificidade dos iniciadores (controles das amostras) e uma alíquota de água deionizada estéril foi empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR (controle da reação).

A amplificação foi realizada no equipamento termociclador Peltier Thermal Cycler, modelo PTC-200, MJ Research, nas seguintes condições: desnaturação inicial 95°C por 2 minutos; 30 ciclos: 94°C por 20 segundos, 58°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos e uma extensão adicional a 72°C por 1 minuto.

As cepas que não apresentaram fragmentos nas condições acima foram submetidas ao PCR utilizando iniciadores específicos para o gênero *Pseudomonas* (PA-GS-F e PA-GS-R) (SPILKER *et al.*, 2004) (Tabela 1), nas mesmas condições descritas acima.

A amplificação foi realizada no equipamento termociclador Peltier Thermal Cycler, modelo PTC-200, MJ Research, nas seguintes condições: desnaturação inicial 95°C por 2 minutos; 30 ciclos: 94°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos e uma extensão adicional a 72°C por 1 minuto.

As cepas que não apresentaram fragmentos nas condições acima foram submetidas ao PCR, utilizando-se iniciadores universais para bactérias. A mistura de cada reação totalizou 50 µL e foi composta pelos seguintes reagentes: 50 pmol dos iniciadores universais (27 R e 1492F) (LANE, 1991)(Tabela 1), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs - dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN®), solução-tampão da PCR 1X (20mM Tris-HCl-pH8.4, 50mM KCl), ~ 50ng do DNA da amostra e água deionizada estéril (INVITROGEN®).

A amplificação foi realizada no equipamento termociclador Peltier Thermal Cycler, modelo PTC-200, MJ Research, nas seguintes condições: desnaturação inicial 94°C por 3 minutos;

35 ciclos: 94°C por 1,5 minutos, 50°C por 1,5 minuto e extensão a 72°C por 1,5 minutos e uma extensão adicional a 72°C por 15 minutos.

Para visualização dos produtos amplificados, alíquotas de 10 µL dos produtos da reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Sigma®), a 70 volts por 50 minutos. Como tampão de corrida utilizou-se TBE 0,5X. Submeteu-se também à corrida eletroforética o padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder INVITROGEN®). A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (10 mg/mL) e foi analisada através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). O brometo de etídio é um agente intercalante de DNA e permite a visualização das bandas de DNA, quando exposto à luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados pelo Kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen®).

**Tabela 1.** Iniciadores para amplificação do gene 16S RNA utilizados neste estudo

Primer *	Sequência (5' - 3')	Gene alvo	Posição	Tamanho (bp)
PA-GS-F	GACGGGTGAGTAATGCCTA	SSU rRNA <i>Pseudomonas species</i>	95 – 113	618
PA-GS-R	CACTGGTGTTCCTTCCTATA	SSU rRNA <i>Pseudomonas species</i>	693 – 712	
PA-SS-F	GGGGGATCTTCGGACCTCA	SSU rRNA <i>P. aeruginosa</i>	189 – 206	956
PA-SS-R	TCCTTAGAGTGCCCACCCG	SSU rRNA <i>P. aeruginosa</i>	1124 – 1144	
27-F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	SSU rRNA bacteria	8 – 27	1504
1492-R	GGTTACCTTGTTACGACTT	SSU rRNA bacteria	1492 – 1512	

\*R (reverse) and F (forward) são designações para a orientação do primer em relação ao rDNA.

27-F – iniciador universal do gene 16S rRNA

1492-R – iniciador universal do gene 16S rRNA

### 3.5.3. Sequenciamento

Após a extração e purificação dos DNA, dois isolados de *P. aeruginosa* da ETE foram aleatoriamente selecionados, para a realização do sequenciamento. O DNA dos isolados foram quantificados e suas concentrações ajustadas para 200 ng/ $\mu$ L.

Utilizou-se o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing* e a reação de sequenciamento foi constituída de 5,5  $\mu$ L de DNA (200ng), 2  $\mu$ L de iniciador (PA-SS-F)(1,6 pmol/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de reativo BigDye (Applied Biosystems), 1,5  $\mu$ L de tampão BigDye, num volume final de 10  $\mu$ L. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador Apollo<sup>TM</sup> ATC 401 com as seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A seguir, o produto das reações foi precipitado adicionando-se a cada poço 30  $\mu$ L de isopropanol 75%. A placa foi levada ao vortex e submetida a um “spin” por 10 segundos a 1000 rpm. A placa ficou em repouso sob proteção da luz por 15 minutos. A placa foi centrifugada por 90 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de isopropanol. Adicionou-se 50  $\mu$ L de etanol 75% em cada poço. Centrifugou-se por 30 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de etanol. A placa foi colocada invertida na centrífuga e deu-se um pulso até 500 rpm. A placa foi deixada à temperatura ambiente, protegida da luz, por 2 horas para secar. Após, o DNA presente no poço da placa, foi ressuspendido em 5,5  $\mu$ L de água (GIBCO®). Deixou-se em repouso por 1 hora e agitou-se no vortex.

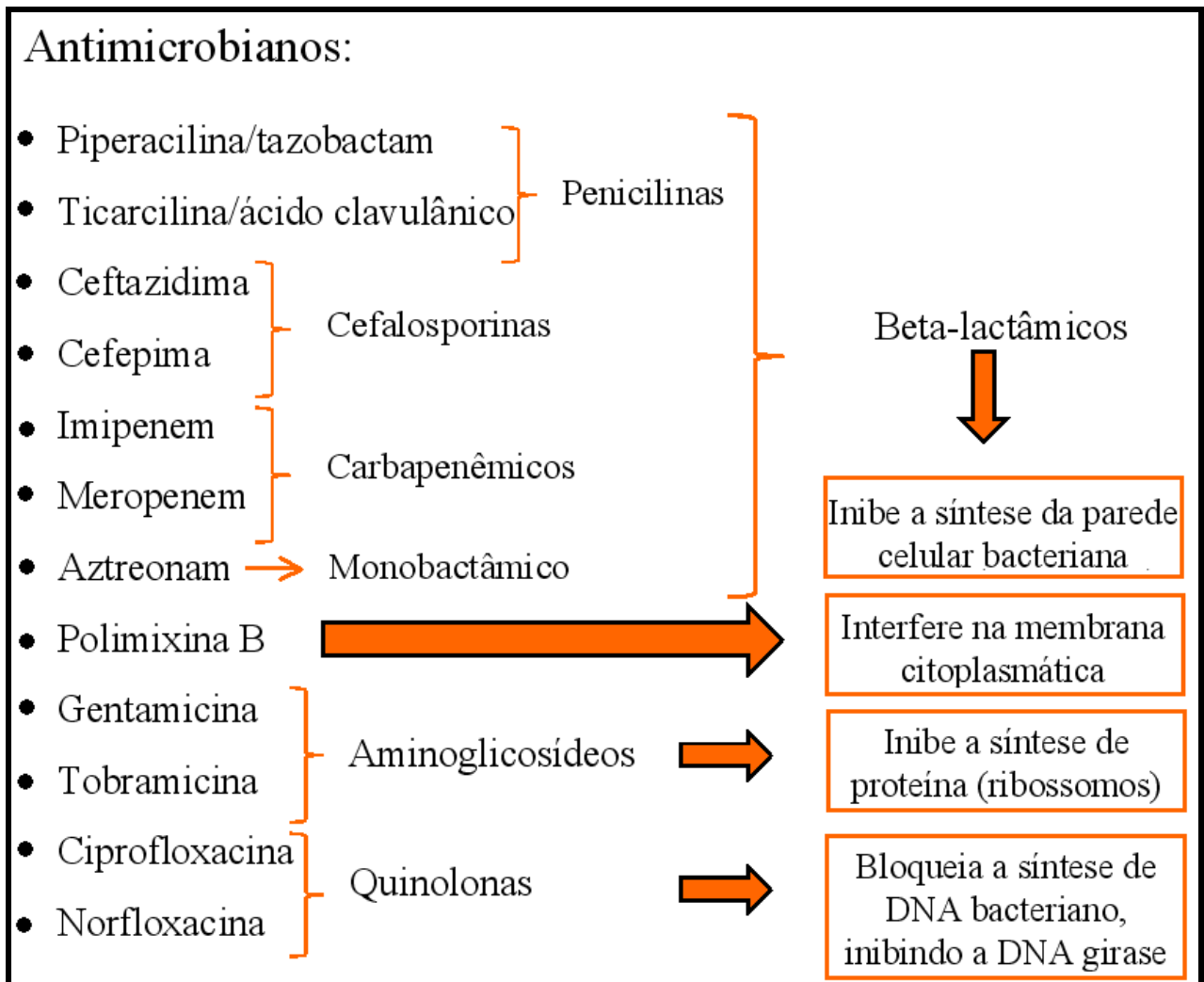
Após, a placa foi encaminhada para o setor de sequenciamento para a reação de desnaturação. A reação de sequenciamento foi realizada segundo metodologia padrão, por eletroforese capilar em um aparelho ABI Prism 3700 Genetic Analyzer Sequencer usando o kit *BigDye*<sup>®</sup> *Terminator* (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ).

Para as amostras que não apresentaram fragmentos na PCR utilizando-se iniciadores para a espécie *P. aeruginosa* e gênero *Pseudomonas*, realizou-se a reação de sequenciamento utilizando iniciador universal do gene 16S rRNA(27-F), nas mesmas condições descritas acima.

### 3.6. Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos

Foi empregado o método de difusão de discos em ágar Mueller-Hinton de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standard Institute – CLSI, 2008, para avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *P. aeruginosa* isoladas da ETE. Inoculou-se com uma alça descartável, uma quantidade mínima do cultivo do ágar nutriente numa solução com 3 mL de salina estéril a 0,5%. A suspensão obtida foi comparada com a turbidez de uma ampola com escala 0,5 de McFarland ( $1-2 \times 10^8$  UFC/mL). Após a homogeneização da suspensão, essa foi semeada em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, usando-se um swab. O swab foi umedecido com a solução bacteriana e o excesso retirado comprimindo-se o mesmo contra as paredes do tubo contendo a solução. A inoculação no ágar foi feita em toda a extensão do meio de cultura girando-se a placa. Após aproximadamente 15 minutos de semeadura, os discos de difusão foram colocados sobre o ágar com o auxílio de uma pinça. Para cada amostra utilizou-se 12 discos de antimicrobianos (SENSIFAR), apresentados a seguir: piperacilina/tazobactam (100/10µg); ticarcilina/ácido clavulânico (75/10µg); ceftazidima (30µg); cefepima (30µg); imipenem (10µg); meropenem (10µg); polimixina B (300 UI); aztreonam (30µg); gentamicina (10µg); tobramicina (10µg); ciprofloxacina (5µg) e norfloxacina (10µg) (Figura 5). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após, examinou-se cada placa para verificar se houve uniformidade no crescimento bacteriano, se havia presença de contaminantes e se os halos de inibição resultantes eram circulares. Após 24 horas, conforme estabelecido pelo CLSI (2008), com o auxílio de um paquímetro, foi realizada a medição dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento bacteriano presentes ao redor dos discos de antimicrobianos, e as amostras foram classificadas em sensíveis, ou resistentes, utilizando-se os limites de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI (2008). O controle de qualidade foi realizado com cepas padrão de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *E. coli* (ATCC 25922), sob as mesmas condições de meio de cultivo e incubação.

O critério utilizado para definir uma cepa como multidrogas resistente (MDR), foi a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos utilizados: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e quinolonas (FALAGAS *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Classes e mecanismos de ação dos antimicrobianos utilizados

### 3.7. Preservação dos isolados

Logo após o isolamento, as cepas foram preservadas em caldo BHI com glicerol a 20% e estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Após a identificação fenotípica e molecular, os isolados foram preservados por liofilização (ANEXO C) e armazenados na Coleção de Micro-organismos do INCQS/ FIOCRUZ.

### 3.8. Construção das bibliotecas gênicas

#### 3.8.1. Extração do DNA genômico

O procedimento usado para extração do DNA foi uma versão modificada dos protocolos descritos previamente (OGRAM *et al.*, 1987; SMALLA *et al.*, 1993; GROBKOPF, 1998). Para a extração do DNA genômico, 35 mL de cada uma das 5 amostras correspondentes as etapas da estação de tratamento do esgoto (ETE 1, ETE 2, ETE 3, ETE 4 e ETE 5), foram centrifugadas a 2800 rpm por 15 minutos. O pellet foi ressuspendido em 1 mL de PBS, centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado (2 vezes). O pellet foi ressuspendido em 1 mL de PBS para ser submetido ao choque térmico pelo *Freeze-Thaw*:  $-70^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos;  $65^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos (3 vezes). Foi acrescentado 125  $\mu\text{L}$  de lisozima e incubado por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Acrescentou-se 235  $\mu\text{L}$  de SDS 10%, homogeneizou-se e incubou-se por 10 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$ . Foi acrescentado 300  $\mu\text{g}$  de Glass bead (0,1 mm-vidro ou zircão) e colocado no aparelho mini-beadbeater (Biospec Products) por 80 segundos à velocidade máxima (3 vezes). Centrifugou-se a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido. Após, as amostras foram submetidas à extração de DNA genômico segundo o protocolo para bactéria Gram positiva do kit *Dnaeasy® & Blood Tissue* (Qiagen®).

Para visualização da integridade do DNA genômico, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  dos produtos da reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma®), a 70 volts por 50 minutos. Como tampão de corrida utilizou-se TBE 0,5X. Submeteu-se também à corrida eletroforética o padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder). A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (10 mg/mL) e foi analisada através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

### 3.8.2. Reação em Cadeia pela Polimerase com DNA metagenômico

Para as bibliotecas do gene 16S rRNA, foi realizada a PCR. A mistura de cada reação totalizou 50 µL e foi composta pelos seguintes reagentes: 25 pmol dos iniciadores específicos para o gênero *Pseudomonas* (PA-GS-F e PA-GS-R)(SPILKER *et al.*, 2004)(Tabela 1), 2.0 mM de solução de MgSO<sub>4</sub>, 1U de *Taq* DNA polimerase HotStar HiFidelity, solução tampão da PCR HotStar HiFidelity 1X (Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 7.5 mM de MgSO<sub>4</sub>, albumina de soro bovina, Triton® X-100, fator SB e 1.5 mM dNTPs), ~ 50ng do DNA da amostra e água livre de RNase q.s.p 50 µL. As cepas de referência *P. aeruginosa* INCQS: 00027/ATCC 29336 e *Escherichia coli* INCQS: 00031/ATCC 10536 foram empregadas para avaliar a especificidade dos iniciadores (controles das amostras) e uma alíquota de água deionizada estéril foi empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR (controle da reação).

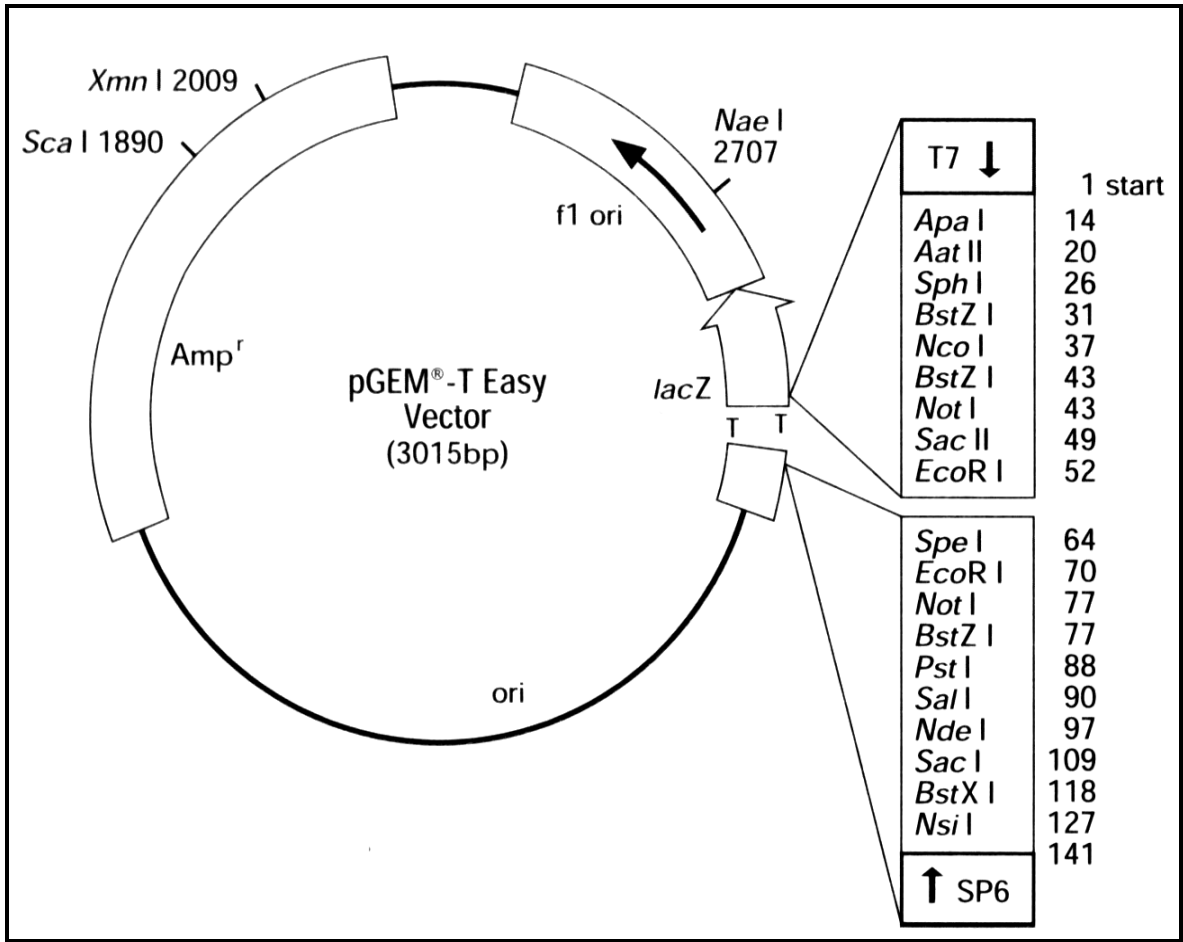
A amplificação foi realizada no equipamento termociclador Peltier Thermal Cycler, modelo PTC-200, MJ Research nas seguintes condições: desnaturação inicial 95°C por 2 minutos; 30 ciclos: 94°C por 20 segundos, 52°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos e uma extensão adicional a 72°C por 1 minuto.

Para visualização dos produtos amplificados, alíquotas de 10 µL dos produtos da reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Sigma®) em tampão TBE 0,5X com a inclusão de um padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder) em cada gel. A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (10 mg/mL) e foi analisada através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). Os produtos da PCR foram purificados pelo Kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen®).

### 3.8.3. Clonagem dos produtos de PCR

Os produtos de PCR das cinco estações de coleta, foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T® Easy (Promega®)(Figura 6) com T4 DNA ligase de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram clonados utilizando-se o kit comercial pGEM-T Easy Vector System I (Promega®). A mistura de cada reação totalizou 11 µL e foi composta por 50 ng de vetor pGEM-T, produto de PCR (aproximadamente 20 ng de DNA), 3 unidades de enzima T4 DNA ligase e tampão de reação (60 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% polietilenoglicol).





**Figura 6.** Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega®)

### 3.8.4. Preparo das células competentes de *Escherichia coli*

Foi inoculada 1 colônia de *Escherichia coli* (cepa DH10B) em 5 mL de meio de cultura, deixando agitar durante a noite em um shaker à 37°C. O pré-inóculo foi transferido para 500 mL de meio LB e foi deixado sob agitação a 37°C até a leitura da absorbância atingir o ponto ideal (Absorbância<sub>600nm</sub> entre 0,5 a 0,8). Deixou-se no gelo por 15 minutos e centrifugou-se a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. O pellet foi ressuscitado em um volume total de 500 mL de água gelada autoclavada e centrifugou-se novamente a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. Novamente o pellet foi ressuscitado em um volume final de 0,25 L de água gelada, e centrifugou-se mais uma vez a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. Ressuspendeu-se o pellet em 6 mL de glicerol a 10% e centrifugou-se a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. Nesta última etapa, as células foram ressuscitadas em um volume final de 1 mL de glicerol a 10%. Foram feitas alíquotas de 40 µL, as quais foram estocadas no freezer a -70°C (DOWER *et al.*, 1988).

### 3.8.5. Transformação das células competentes por eletroporação

Antes da transformação, todas as reações de ligação foram dialisadas (para retirar o sal excessivo). O eppendorf contendo o mix da ligação foi colocado em um bécher com água e deixado 2 horas em temperatura ambiente. Após esse tempo, o eppendorf foi incubado overnight a 4°C. No dia seguinte, colocou-se todo o volume da ligação sobre uma membrana (Millipore 0,025 µm, Type VS), a qual foi deixada em contato com água destilada estéril, por 2 horas.

Foi misturado em uma cubeta de eletroporação de 1mm (BioRad), previamente resfriada, 5µL do produto da ligação dialisada com 45µL de células competentes (*E. coli*, DH10B). A eletroporação foi efetuada em um aparelho GenePulser Xcell™ (BioRad) ajustado para as seguintes condições: 1,8 kv, 200 Ω e 25 µF. Em seguida, acrescentou-se 1mL de meio de cultura LB na cubeta, transferindo-se o conjunto para tubos falcon e deixou-se agitando por 1 hora a 37°C. Após o tempo de recuperação, plaqueou-se 200µL da amostra em placa de LB contendo 150 µg/mL de ampicilina, 200 µL de X-Gal (20mg/mL) e 30 µL de IPTG (1M) e incubou-se overnight em estufa a 37°C. Esse procedimento foi realizado para as amostras referentes aos 5 pontos de coleta.

### 3.8.6. Seleção de clones transformantes

As placas foram retiradas da estufa. As colônias azuis foram descartadas e as colônias transformantes (brancas) foram coletadas aleatoriamente com o auxílio de palitos de madeira esterilizados por autoclavagem. Os clones foram organizados em microplacas “Deep well” de 96 poços contendo 1 mL de meio de cultivo Circle Grow (CG) com ampicilina (100 µg/mL) e 12% de glicerol. As placas foram então seladas com adesivos que foram furados com uma agulha em cada poço correspondente para permitir a aeração durante o crescimento das bactérias. As placas foram incubadas durante 24 horas em shaker a 37°C. Após a incubação as bibliotecas foram armazenadas a -70°C (GIOVANNONI *et al.*, 1990; CLEMENTINO *et al.*, 2007).

### 3.8.7. Mini-Preparação (extração do DNA plasmidial)

As placas “Deep well” foram descongeladas e centrifugadas (Excelsa® 3 Modelo 280 marca FANEM ®) por 20 minutos a 2000 rpm. O meio foi descartado, invertendo a placa em balde com água sanitária, observando a formação do pellet. A placa foi colocada invertida sobre papel toalha, para absorver o excesso de meio, por aproximadamente 1 minuto. Foi adicionado, em cada poço, 200µL de GET (APÊNDICE D) para lavar o pellet por vortex. A placa foi agitada vigorosamente até que todas as células ficassem totalmente ressuspensas de forma homogênea. Centrifugou-se por 16 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado. Fez-se um mix com 19,8 mL de GET + 200µL de RNase (40mg/mL) e foi colocado 80 µL desta mistura por poço. A placa foi selada com adesivo e agitada no agitador de placas (vortex) por 2 minutos. O pellet ficou totalmente ressuspensado. A placa foi deixada em temperatura ambiente por 20 minutos. Foi adicionado solução de lise (NaOH 0,2 M + SDS 1%) (Apêndice I) em cada poço. A placa foi selada e invertida 10 vezes. Deu-se spin e esperou-se 2 minutos. Foi adicionado em cada poço 100 µL de NaOAc 3M pH 4,6 gelado. A placa foi selada com adesivo e misturou-se 10 vezes por inversão. Esperou-se 3 minutos. A placa ficou “overnight” no freezer a -80°C. No dia seguinte, esperou-se a placa descongelar bem. Centrifugou-se por 30 minutos a 2000 rpm. Fixou-se com fita adesiva, uma placa Millipore (MAGV N22) no topo de uma microplaca de fundo “V” de 250 µL de polipropileno, verificando se os poços estavam realmente alinhados para que um clone não se misturasse a outro durante o processo de filtragem. Transferiu-se 150 µL do sobrenadante para a placa Millipore. A placa ficou 15 minutos a -20°C para compactar o “debris”. Após, centrifugou-se

por 40 minutos a 2000 rpm. A placa Millipore foi removida e descartada. Ao filtrado foi adicionado 90  $\mu\text{L}$  de isopropanol (gelado). A placa foi selada com adesivo e invertida novamente 10 vezes. O material foi centrifugado por 90 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado nos poços. A placa foi centrifugada por 40 minutos a 2000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e deu-se um “spin” (até 300 rpm) invertido sobre papel toalha. Para secagem do precipitado formado, a placa foi deixada aberta durante 10 minutos na estufa a 37°C. O DNA foi ressuspensionado com 40  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q autoclavada. A placa foi coberta com adesivo e ficou-se a temperatura ambiente por 30 minutos. Após, a placa foi agitada no vortex e guardada na geladeira.

### **3.8.8. Sequenciamento dos clones**

#### **3.8.8.1. Preparo das amostras para sequenciamento**

Após a extração dos plasmídeos (Mini-Preparação), o DNA foi quantificado e sua concentração ajustada para 200 ng/ $\mu\text{L}$ .

As amostras para sequenciamento foram preparadas, em microplaca de 96 poços, com o kit de reação *ABI Prism<sup>®</sup> BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready* (Applied Biosystems), nas seguintes proporções: 2  $\mu\text{L}$  do iniciador (1,6 pmol/ $\mu\text{L}$ ) para o gênero *Pseudomonas* (PA-GS-F), 2  $\mu\text{L}$  do tampão 5X (400 mM Tris-HCl pH 9; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 1  $\mu\text{L}$  de reativo BigDye (Applied Biosystems®), 5,5  $\mu\text{L}$  de DNA (200-300ng), totalizando 10  $\mu\text{L}$ . A reação foi realizada no termociclador Apollo<sup>TM</sup> ATC 401 nas seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

#### **3.8.8.2. Purificação e precipitação da reação de sequenciamento**

Nesta etapa, as amostras obtidas na PCR, foram precipitadas e limpas dos didesoxinucleotídios fluorescentes não incorporados durante a síntese de moléculas de DNA. Estes didesoxinucleotídios livres interferem com a leitura das bases durante o sequenciamento.

A precipitação, para a reação de sequenciamento do DNA, ocorreu da seguinte maneira: adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75% em cada poço. A placa foi levada ao vortex e submetida a um “spin” por 10 segundos a 1000 rpm. A placa ficou em repouso sob agitação da luz por 15

minutos. A placa foi centrifugada por 90 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de isopropanol. Adicionou-se 50 µL de etanol 75% em cada poço. Centrifugou-se por 30 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de etanol. A placa foi colocada invertida na centrífuga e deu-se um pulso até 500 rpm. A placa foi deixada à temperatura ambiente, protegida da luz, por 2 horas para secar. Após, o DNA presente no poço da placa, foi ressuscitado em 5,5 µL de água (GIBCO®). Deixou-se em repouso por 1 hora e agitou-se no vortex.

Após, as placas foram encaminhadas para o setor de Sequenciamento para a reação de desnaturação. Após essa etapa as placas foram encaminhadas para o Sequenciador de DNA (Applied Biosystems modelo ABI 3700). A reação de sequenciamento foi realizada segundo metodologia padrão, por eletroforese capilar em um aparelho ABI Prism 3100 Genetic Analyzer Sequencer usando o kit *BigDye*® *Terminator* (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ).

### **3.9. Análise de resultados**

#### **3.9.1. Análise das sequências do gene 16S rRNA**

Após a reação de sequenciamento dos clones, cada cromatograma obtido foi fornecido como arquivo de entrada ao programa PhredPhrap (EWING *et al.*, 1998), que o transforma em dois arquivos de saída; um arquivo “fasta” onde cada pico do cromatograma é traduzido para sua base nitrogenada correspondente (A, T, C ou G) e um arquivo “qual” onde cada base recebe um valor de qualidade, que reflete o grau de confiança que se tem naquela base. As sequências com mais de 300 bases apresentando “Phred score” com uma qualidade maior ou igual a 20 foram incluídas nas análises subsequentes; as demais foram descartadas. Sequências válidas foram comparadas com sequências do Ribosomal Database Project II (<http://www.rdp.cme.msu.edu>) (COLE *et al.*, 2003). A análise de similaridade das sequências foi realizada “on line” pelo programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Os alinhamentos com sequências de referência do banco de dados foram realizados utilizando o

programa ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997). As sequências geradas neste estudo foram depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Regiões iniciais contendo sequências de vetores foram extraídas com o auxílio do módulo de análise de sequências da ferramenta VecScreen disponível no NCBI. As sequências também foram analisadas para identificação de quimeras pelo programa “Bellerophon” (HUBER *et al.*, 2004).

### **3.9.2. Análise filogenética e Índices de Diversidade**

As sequências foram em seguida agrupadas em OTU a um nível de estrigência de 97% utilizando o software MOTHUR (SCHLOSS *et al.*, 2009). As árvores filogenéticas foram construídas pelo método *neighbor-joining* (SAITOU & NEI, 1987) baseadas na estimativa de distância calculada pelo algoritmo Kimura-2 (KIMURA, 1980). A construção das árvores foi feita no programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011) e a análise de *bootstrap* foi conduzida com 1000 replicatas. Para verificar se as diferenças observadas na composição das comunidades bacterianas eram estatisticamente relevantes, as cinco bibliotecas foram comparadas utilizando a estatística de  $\beta$ -LIBSHUFF (SINGLETON *et al.*, 2001), que usa o método de Monte Carlo para gerar curvas de cobertura homólogas e heterólogas a partir das bibliotecas do gene 16S rRNA.

Com o objetivo de visualizar melhor os padrões globais de variação, foi utilizado o UniFrac (LOZUPONE & KNIGHT, 2006) que baseado nas informações filogenéticas permite observar as diferenças entre os ambientes graficamente. Diagrama de Venn foi realizado para comparar OTUs comuns entre as bibliotecas com programa MOTHUR (SCHLOSS *et al.*, 2009).

### **3.9.3. Números de acesso das sequências de nucleotídeos**

Todas as sequências de 16S rDNA obtidas neste estudo foram cadastradas no Banco Internacional de Genes (GenBank) e receberam os seguintes números de acesso: JF716352-JF716444.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Dosagem dos parâmetros físicos e químicos

O pH dos cinco pontos analisados se manteve entre 6,0 e 6,8, dentro da faixa de pH de crescimento da maioria dos micro-organismos, inclusive a *P. aeruginosa* (Tabela 2).

A turbidez apresentou concentrações elevadas nos pontos ETE 1 e ETE 2, principalmente devido à presença de sólidos suspensos na água. A presença de matéria orgânica, micro-organismos e outros materiais diversos provocam a dispersão e a absorção da luz, dando à água uma aparência nebulosa. Os outros pontos apresentaram valores menores (Tabela 2).

Os níveis de oxigênio dissolvido apresentaram o maior e o menor valor nos pontos ETE 2 e ETE 3, respectivamente. No ponto ETE 2 onde ocorre a aeração, o pH se manteve neutro e eleva os níveis de OD que é essencial para os micro-organismos biodegradadores de matéria orgânica. No ponto ETE 3, o OD diminui uma vez que durante a estabilização da matéria orgânica, os micro-organismos aeróbios presentes fazem uso do oxigênio nos seus processos respiratórios causando uma redução acentuada da sua concentração no meio (Tabela 2).

A temperatura dos 5 pontos de coleta manteve-se a 30°C favorecendo as formas mesófilas presentes (Tabela 2).

A concentração de cloro estava bastante alta no ponto ETE 4, ponto que é adicionado o cloro líquido ao tanque. Devido principalmente a presença do íon hipoclorito em alta concentração, a condutividade também estava alta nesse ponto que é diretamente proporcional à ionização de substâncias dissolvidas no líquido. A dissolução de eletrólitos em água aumenta a condutividade.

As concentrações de cloro se apresentaram constantes em torno de 1 ppm nos pontos ETE 1, 2, 3 e 5. No entanto, o ponto ETE 4, onde é adicionado o cloro, apresentou valor superior a 10 ppm o que proporcionou um aumento da condutividade (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parâmetros físicos e químicos dos pontos de coleta da estação de tratamento de esgoto

Parâmetros	Escala	Pontos de coleta				
		ETE 1	ETE 2	ETE 3	ETE 4	ETE 5
pH	0 - 14	6,8	6,1	6,1	6,3	6,0
Condutividade (MS/cm)	0 - 100	0,39	0,31	0,29	0,52	0,29
Turbidez (UNT)	0 - 800	18	26	14	12	13
OD (mg/L)	0 - 19,9	4,4	7,6	1,5	3,5	3,4
Temperatura (°C)	0 - 50	29	30	30	30	30
Salinidade (%)	0 - 4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cloro (ppm)	0,01 - 10	1	1	1	> 10	1

Os valores da escala foram estabelecidos de acordo com o manual dos equipamentos Horiba® e Extech®.

#### 4.2. Identificação fenotípica de *P. aeruginosa*

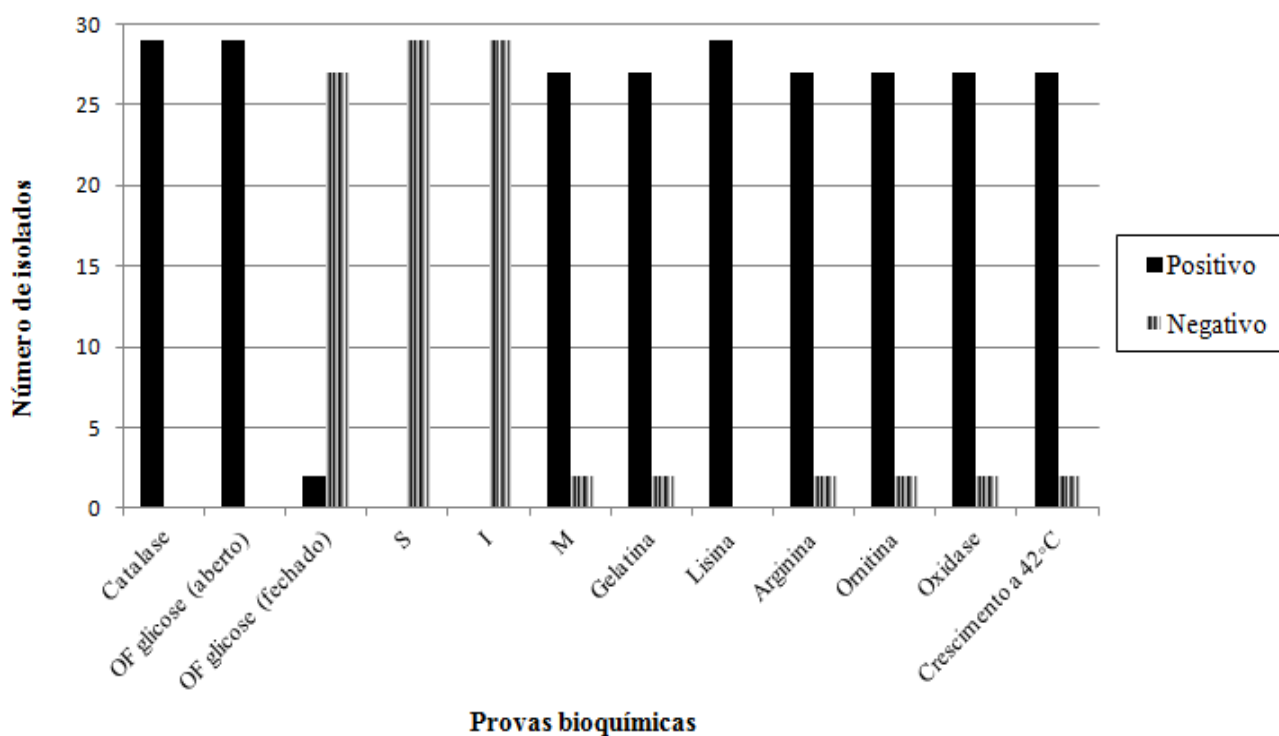
Após 24 horas de incubação, as 4 placas de ágar cetrímide referentes aos pontos ETE 1, 2, 3 e 5, apresentaram crescimento bacteriano uniforme com colônias lisas. Foram selecionadas aleatoriamente, um total de 29 colônias: 6 colônias do ponto ETE 1, 6 colônias do ponto ETE 2, 8 colônias do ponto ETE 3 e 9 colônias do ponto ETE 5 (Tabela 3). Vinte e sete isolados apresentaram colônias com pigmento esverdeado e odor adocicado. A coloração de Gram dos 29 isolados revelou a presença de bactérias Gram negativas na forma de bastonetes. A caracterização bioquímica mostrou mobilidade e resultados positivos para catalase, oxidase, lisina, ornitina, arginina, gelatina, oxidação-fermentação da glicose e crescimento a 42°C (Gráfico 2). Dos 29 isolados, 27 foram identificados como *P. aeruginosa* (93,1%): 5 isolados do ponto ETE 1, 6 isolados do ponto ETE 2, 8 isolados do ponto ETE 3 e 8 isolados do ponto ETE 5. Os isolados do ponto ETE 1 (1.6) e do ponto ETE 5 (5.4B), não apresentaram mobilidade e apresentaram resultados negativos para testes da gelatina, arginina, ornitina, oxidase e crescimento a 42°C, descartando a possibilidade de ser *P. aeruginosa*. Estes isolados foram estocados em caldo BHI com glicerol 20% a -20°C para futura investigação.

A placa de ágar cetrímide do ponto ETE 4, não apresentou crescimento após 24 horas de incubação. Entretanto, após 72 horas, foi observado a presença de 2 colônias. A coloração de Gram revelou a presença de bacilos gram positivos, formadores de esporos. Estas foram estocadas em caldo BHI com glicerol 20% a -20°C para futura investigação.



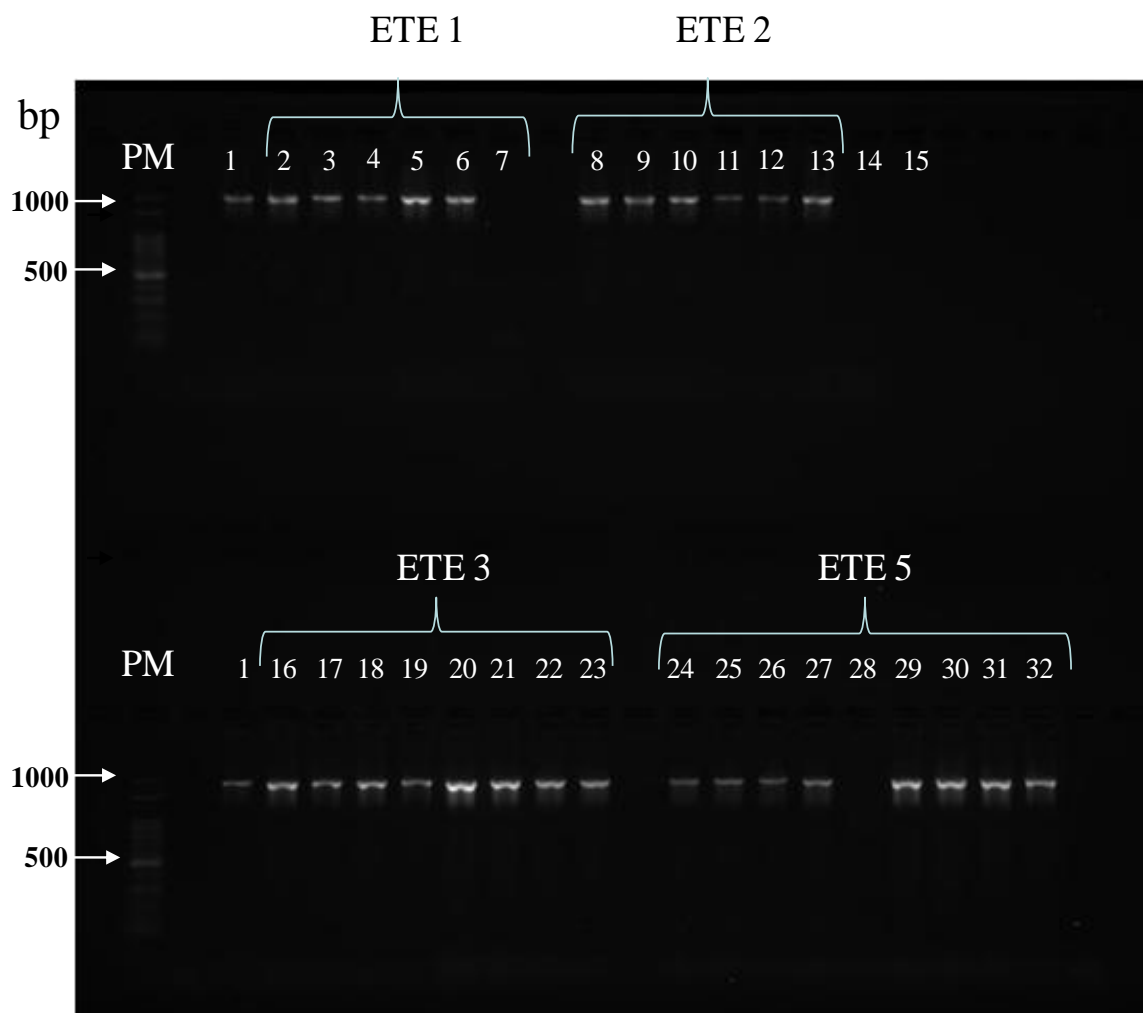
**Tabela 3.** Relação dos isolados nos pontos de coleta das amostras

Pontos de coleta	Quantidade de isolados obtidos (n = 29)								
	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	3.7	3.8	
ETE 1									
ETE 2	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6			
ETE 3	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6			
ETE 5	5.1	5.2	5.3	5.4 A	5.4 B	5.5	5.6	5.7	5.8

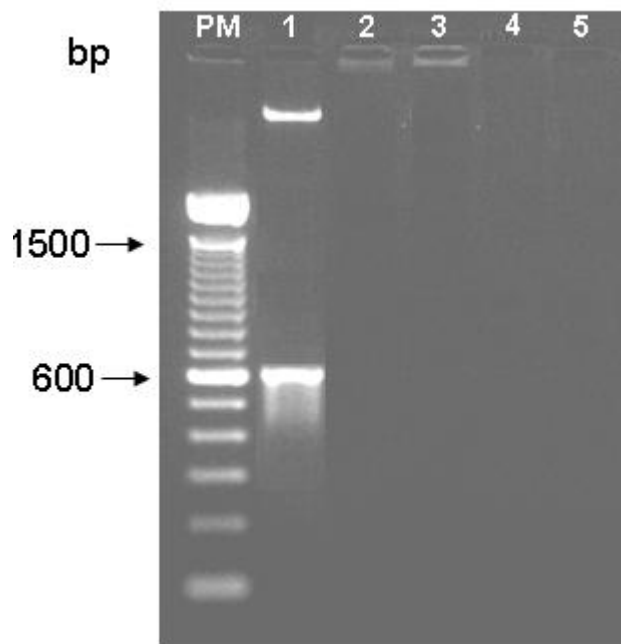
**Gráfico 2.** Resultados das provas bioquímicas dos 29 isolados. OF - oxidação/fermentação da glicose; SIM - Sulfeto/ Indol/ Mobilidade

### 4.3. Identificação molecular de *P. aeruginosa*

Os 27 isolados bioquimicamente identificados como *P. aeruginosa* foram confirmados por análise da PCR usando iniciadores específicos para *P. aeruginosa* e apresentaram fragmentos de 956 bp (Figura 7A). A análise de identidade das sequências realizada pelo BLASTn mostrou valores de similaridade entre 97-98% do gene 16S rRNA com *P. aeruginosa* de referência para os 27 isolados. Os dois isolados do ponto ETE 1 (1.6) e ponto ETE 5 (5.4B) foram submetidos a PCR usando iniciadores para o gênero *Pseudomonas* e não apresentaram amplificação (Figura 7B). Os dois isolados foram amplificados utilizando-se iniciadores universais para o gene 16S rRNA (Figura 7C) e apresentaram fragmento de 1504 bp. A análise de identidade das sequências no BLASTn mostrou identidade de 98% com a espécie *Klebsiella pneumoniae*. Os 2 isolados do ponto ETE 4 foram amplificados com os iniciadores universais para o gene 16S rRNA e apresentaram fragmentos de 1504 pb (Figura 7C). A análise de identidade das sequências no BLASTn mostrou identidade de 97 % com *Bacillus* sp.



**Figura 7A.** Reação da PCR com iniciadores específicos para *Pseudomonas aeruginosa*. PM – peso molecular 50 pb DNA ladder (Ludwig); **1.** *P. aeruginosa* INCQS 00027/ATCC 29336; **2.** ETE 1.1; **3.** ETE 1.2; **4.** ETE 1.3; **5.** ETE 1.4; **6.** ETE 1.5; **7.** ETE 1.6; **8.** ETE 2.1; **9.** ETE 2.2; **10.** ETE 2.3; **11.** ETE 2.4; **12.** ETE 2.5; **13.** ETE 2.6; **14.** *E. coli* INCQS 00031/ATCC 10536; **15.** H<sub>2</sub>O; **16.** ETE 3.1; **17.** ETE 3.2; **18.** ETE 3.3; **19.** ETE 3.4; **20.** ETE 3.5; **21.** ETE 3.6; **22.** ETE 3.7; **23.** ETE 3.8; **24.** ETE 5.1; **25.** ETE 5.2; **26.** ETE 5.3; **27.** ETE 5.4A; **28.** ETE 5.4B; **29.** ETE 5.5; **30.** ETE 5.6; **31.** ETE 5.7; **32.** ETE 5.8.



**PM** – peso molecular 100 bp DNA ladder  
(Invitrogen)

**1.** *P. aeruginosa* INCQS 00027

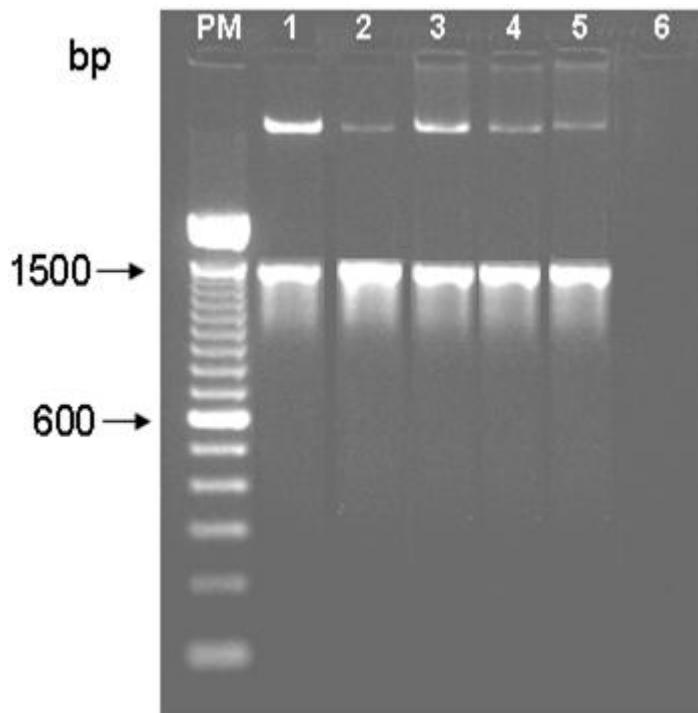
**2.** ETE 1.6

**3.** ETE 5.4 B

**4.** *E. coli* INCQS 00031

**5.** H<sub>2</sub>O

**Figura 7B.** Reação da PCR com iniciadores para o gênero *Pseudomonas*



**PM** – peso molecular 100 bp DNA ladder  
(Invitrogen)

**1.** *P. aeruginosa* ATCC 29336

**2.** ETE 1.6

**3.** ETE 5.4 B

**4.** ETE 4A

**5.** ETE 4B

**6.** H<sub>2</sub>O

**Figura 7C.** Reação da PCR com iniciadores universais do gene 16S rRNA

#### 4.4. Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos

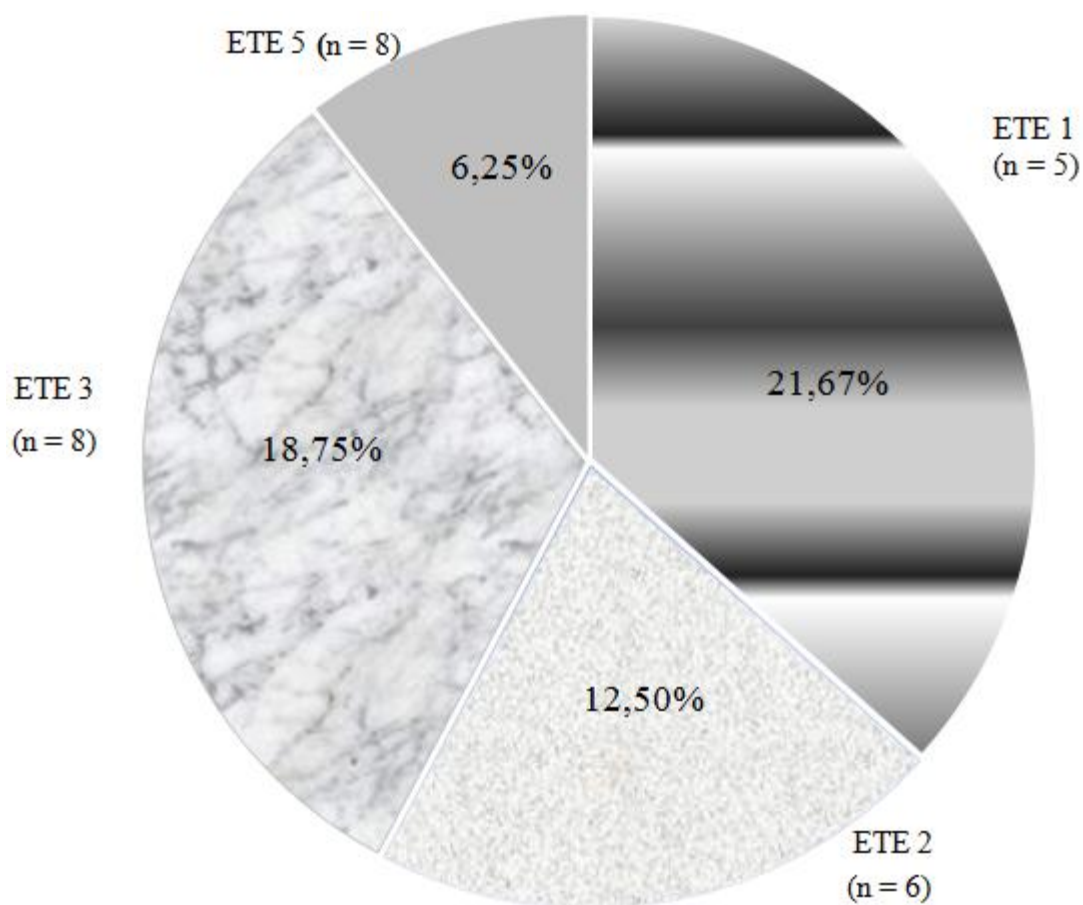
Os 27 isolados de *P. aeruginosa* obtidos na ETE hospitalar foram avaliados frente a 12 antimicrobianos. Nos 4 pontos de coleta, todas as amostras foram suscetíveis aos antimicrobianos piperacilina/tazobactam (100%) e polimixina B (100%). Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram menor susceptibilidade ao antimicrobiano aztreonam, no ponto ETE 1 (20,0%), ponto ETE 2 (0,0%), ponto ETE 3 (37,5%) e ponto ETE 5 (75,0%) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Susceptibilidade (%) dos isolados de *P. aeruginosa* nos 4 pontos de coleta

	Susceptibilidade (%)			
	ETE 1 (n = 5)	ETE 2 (n = 6)	ETE 3 (n = 8)	ETE 5 (n = 8)
<b>Antimicrobianos</b>				
Piperacilina / tazobactam	100	100	100	100
Ticarcilina / ácido clavulânico	80,0	83,3	62,5	75,0
Ceftazidima	100	100	50,0	100
Cefepima	60,0	66,7	75,0	100
Imipenem	80,0	100	100	87,5
Meropenem	60,0	100	100	87,5
Polimixina B	100	100	100	100
Aztreonam	20,0	0,0	37,5	75,0
Gentamicina	80,0	100	100	100
Tobramicina	100	100	75,0	100
Ciprofloxacina	80,0	100	100	100
Norfloxacina	80,0	100	100	100

n = número de isolados

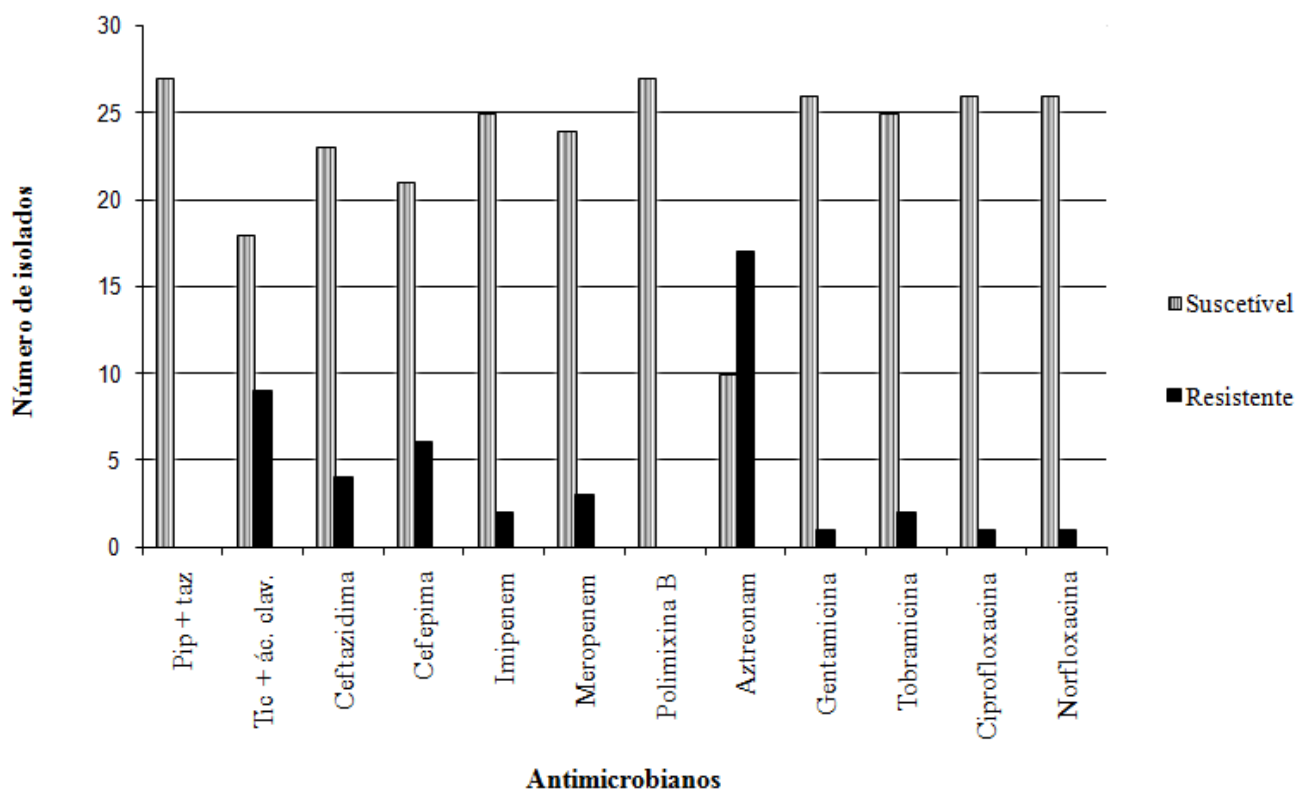
Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram maior índice de resistência no ponto ETE 1 (21,67%), seguido pelos pontos ETE 3 (18,75%), ETE 2 (12,5%) e apresentou menor índice de resistência no ponto ETE 5 (6,25%), a todos os antimicrobianos testados (Gráfico 3).



**Gráfico 3.** Porcentagem de resistência dos isolados de *P. aeruginosa* nas quatro etapas da ETE hospitalar

O gráfico 4 mostra comparativamente o comportamento das cepas de *P. aeruginosa* isoladas da ETE frente aos antimicrobianos testados. Para o antimicrobiano aztreonam, 62,9% (17) dos 27 isolados testados foram resistentes, seguido de ticarcilina/ácido clavulânico, 33,3% (9) dos 27 isolados foram resistentes e cefepima, 22,2% (6) dos 27 isolados testados foram resistentes nos quatro pontos de coleta da ETE. Todos os isolados de *P. aeruginosa* foram suscetíveis aos antimicrobianos piperacilina/tazobactam (100%) e polimixina B (100%). Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram maior índice de resistência a cefepima (22,2%) que a ceftazidima (14,8%).

Observou-se que dos 27 isolados da ETE, 25,9% (n=7) apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos de classes diferentes.



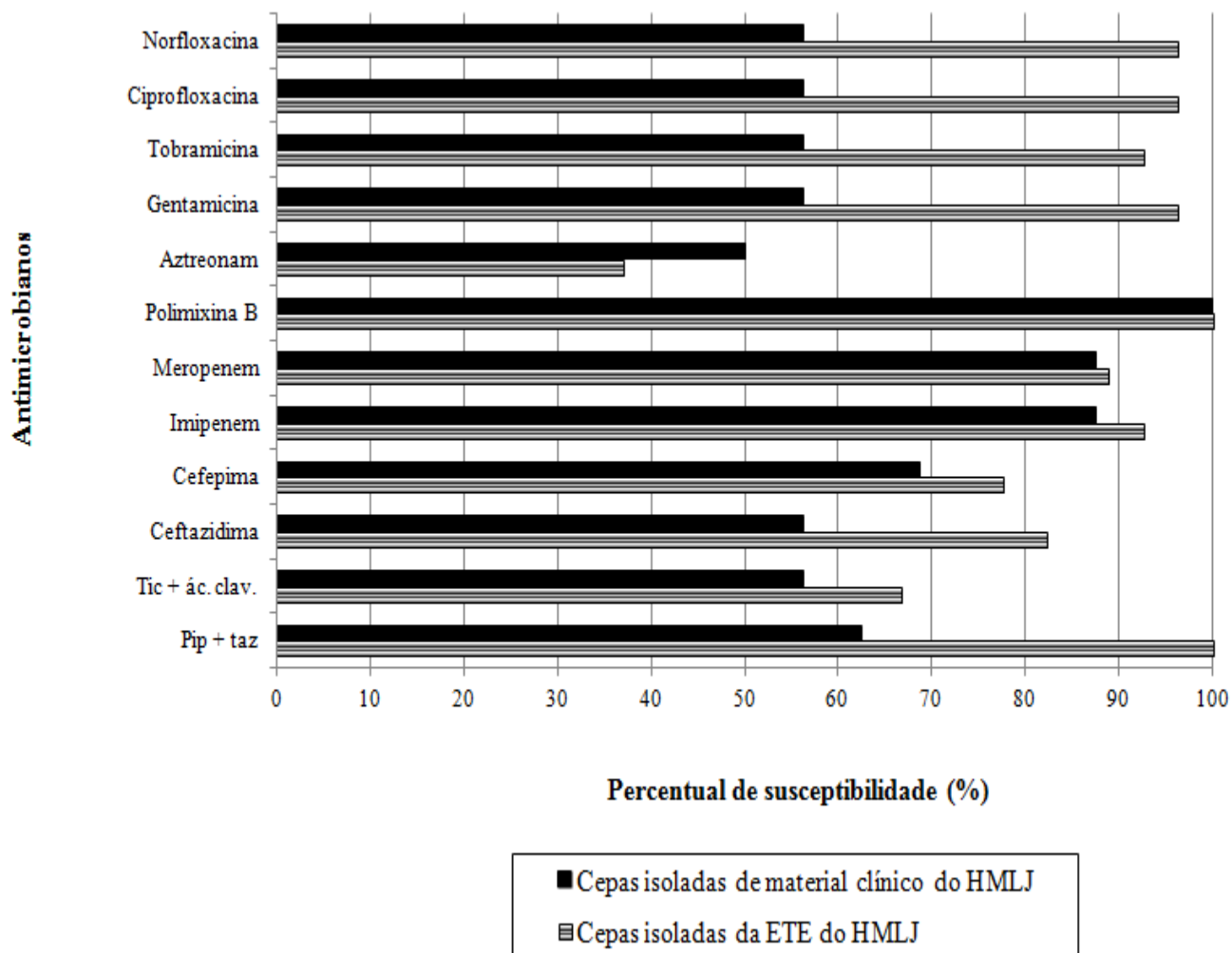
**Gráfico 4.** Perfil de susceptibilidade das cepas de *P. aeruginosa* isoladas da ETE. Pip + taz = piperacilina + tazobactam; Tic + ác.clav. = ticarcilina + ácido clavulânico

O gráfico 5 mostra comparativamente o percentual de susceptibilidade das cepas de *P. aeruginosa* isoladas da ETE do HMLJ e das cepas isoladas de material clínico do HMLJ frente aos 12 antimicrobianos testados. Em ambos locais de isolamento, todas as cepas de *P. aeruginosa* foram sensíveis a polimixina B (100%). Apenas 62,5% das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de material clínico foram suscetíveis a piperacilina/tazobactam, enquanto que 100% das cepas de *P. aeruginosa* isoladas da ETE foram suscetíveis. A susceptibilidade ao aztreonam foi maior nas cepas de *P. aeruginosa* isoladas de material clínico (50%) que nas cepas de *P. aeruginosa* isoladas da ETE (37,1%).

Observou-se que dos 16 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, 43,8% (n=7) apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos de classes diferentes, 12,5% (n=2) apresentaram resistência a 11 antimicrobianos e 31,3% (n=5) foram sensíveis aos 12 antimicrobianos testados.

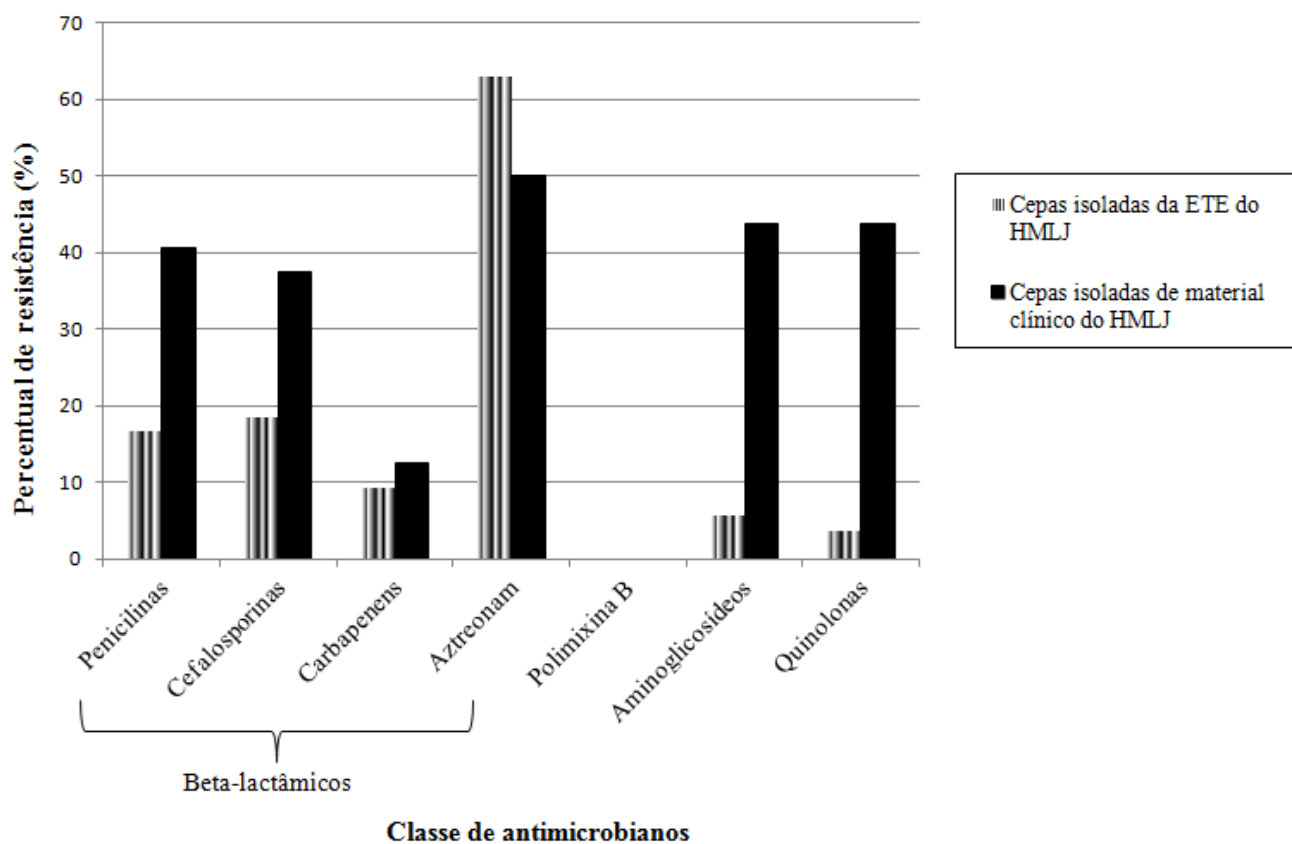
Cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes foram mais frequentes em material clínico (43,8%) que na ETE hospitalar (25,9%).





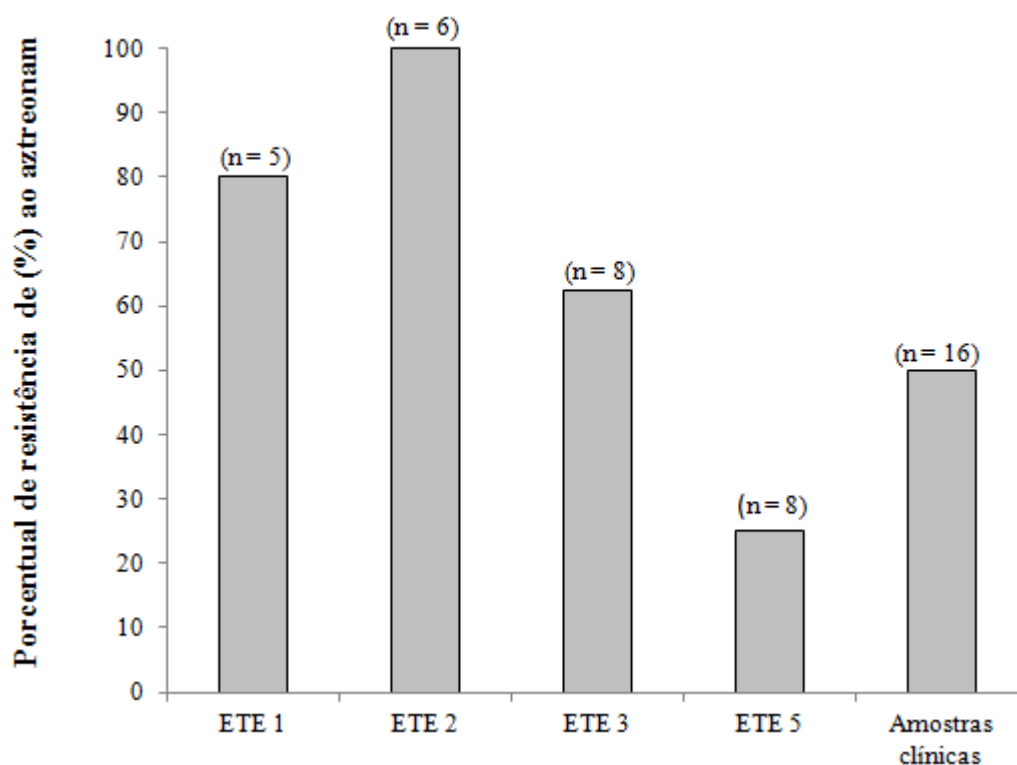
**Gráfico 5.** Percentual de susceptibilidade (%) das cepas de *P. aeruginosa* por local de isolamento. Pip + taz = piperacilina + tazobactam; Tic + ác.clav. = ticarcilina + ácido clavulânico

O gráfico 6 mostra comparativamente o percentual de resistência das cepas isoladas *P. aeruginosa* da ETE do HMLJ e das cepas isoladas de material clínico do HMLJ frente a classe de antimicrobianos. Dos beta-lactâmicos, o aztreonam (monobactâmico) foi o que apresentou maior percentual de resistência tanto nas cepas de *P. aeruginosa* isoladas da ETE (63%) quanto nas cepas de *P. aeruginosa* isoladas de material clínico do HMLJ (50%). Os aminoglicosídeos (43,8%) e quinolonas (43,8%) apresentaram maior percentual de resistência nas cepas de *P. aeruginosa* isoladas de material clínico do HMLJ que nas cepas de *P. aeruginosa* isoladas da ETE.



**Gráfico 6.** Percentual de resistência (%) das cepas de *P. aeruginosa* por local de isolamento frente a classe de antimicrobianos

O gráfico 7 compara o percentual de resistência das cepas de *P. aeruginosa* ao aztreonam nos pontos de coleta da ETE e nas amostras clínicas. Pode-se observar que 80% das cepas de *P. aeruginosa* no ponto ETE 1, 100% das cepas no ponto ETE 2, 62,5% das cepas no ponto ETE 3, 25% das cepas no ponto ETE 5 e 50% das cepas nas amostras clínicas foram resistentes ao aztreonam.



**Gráfico 7.** Percentual de resistência (%) ao aztreonam dos isolados de *P. aeruginosa* em cada ponto de coleta da ETE e nas amostras clínicas

De acordo com a susceptibilidade aos antimicrobianos foram estabelecidos 21 perfis de resistência distintos. O perfil mais frequente foi o nº 1, encontrado em 20% das cepas de *P. aeruginosa* do ponto ETE 1 e 66,7% das cepas de *P. aeruginosa* do ponto ETE 2. Em contrapartida, o segundo perfil mais frequente foi o de nº 6, encontrado em 20% das cepas no ponto ETE 1 e 16,7% das cepas no ponto ETE 2.

**Tabela 5.** Frequência de resistência (%) observada nos isolados de *P. aeruginosa* da ETE (Ambiente I) e de amostras clínicas (Ambiente II)

Perfis	Grupos de antibióticos	Frequência de resistência (%)				
		Ambiente I				Ambiente II
		ETE 1 (n = 5)	ETE 2 (n = 6)	ETE 3 (n = 8)	ETE 5 (n = 8)	Amostras clínicas (n = 16)
1	ATM	20	66,7	-	-	-
2	CAZ	-	-	-	-	6,25
3	TIC	-	-	-	-	6,25
4	TIC/CAZ	-	-	12,5	-	-
5	IMP/MER	-	-	-	12,5	-
6	ATM/CPM	20	16,7	-	-	-
7	ATM/CAZ	-	-	-	-	6,25
8	ATM/TOB	-	-	12,5	-	-
9	ATM/TIC	-	-	-	25	-
10	ATM/TIC/CAZ	-	-	25	-	-
11	ATM/TIC/CPM	-	16,7	-	-	-
12	ATM/CEP/CAZ	-	-	12,5	-	-
13	ATM/TIC/CPM/TOB	-	-	12,5	-	-
14	ATM/TIC/CIP/NOR	20	-	-	-	-
15	ATM/TIC/PPT/CAZ	-	-	-	-	6,25
16	GEN/TOB/CIP/NOR	-	-	-	-	6,25
17	ATM/CPM/IMP/MER/GEN	20	-	-	-	-
18	ATM/GEN/TOB/CIP/NOR	-	-	-	-	6,25
19	ATM/GEN/TOB/CIP/NOR/CPM/TIC/PPT	-	-	-	-	6,25
20	ATM/GEN/TOB/CIP/NOR/CPM/TIC/PPT/CAZ	-	-	-	-	12,5
21	ATM/GEN/TOB/CIP/NOR/CPM/TIC/PPT/CAZ/IMP/MER	-	-	-	-	12,5

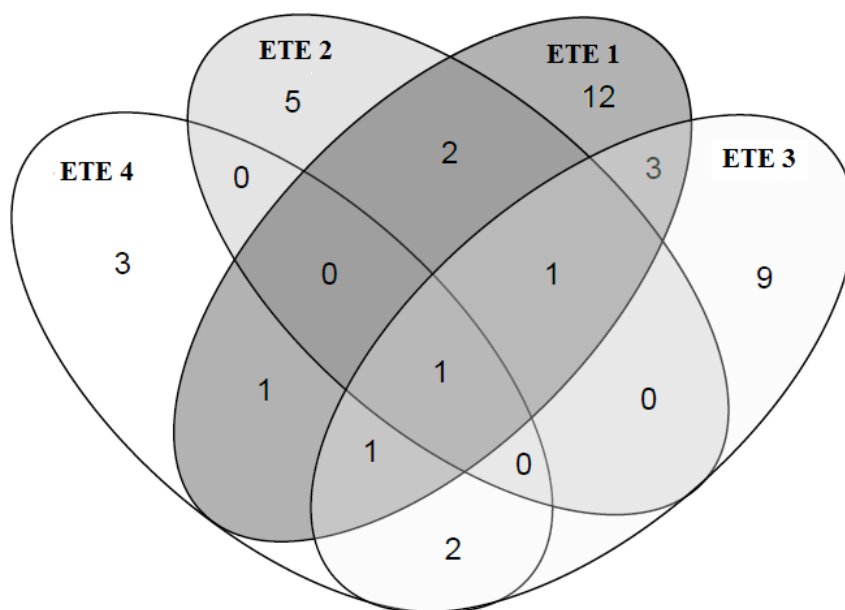
ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; TIC: ticarcilina/ácido clavulânico; IMP: imipenem; MER: meropenem; TOB: tobramicina; CPM: cefepima; CIP: ciprofloxacina; PPT: piperacilina/tazobactam; GEN: gentamicina; NOR: norfloxacina; n: número total de isolados.

#### 4.5. Análise das sequências

Sequências válidas com Phred score  $\geq 20$ , 37/50 do ponto ETE 1; 13/13 do ponto ETE 2; 24/27 do ponto ETE 3; 11/13 do ponto ETE 4 e 8/8 do ponto ETE 5, foram comparadas com sequências do Ribosomal Database Project II. Regiões iniciais contendo sequências de vetores foram removidas (65,1%). Duas sequências foram consideradas quimeras e, portanto foram removidas.

#### 4.6. Análise de diversidade e filogenia

A fim de verificar as intersecções e peculiaridades das bibliotecas obtidas, identificando o número de OTUs compartilhadas entre os pontos ETE 1, ETE 2, ETE 3 e ETE 4, um diagrama de Venn foi gerado no software MOTHUR (Figura 8). A análise de sobreposição de OTU através do diagrama de Venn mostra que somente uma OTU é compartilhada entre os pontos ETE 1, 2, 3 e 4 (Figura 9). Entre as bibliotecas, três OTUs foram comuns entre os pontos ETE 1 e ETE 3, duas OTUs foram comuns entre os pontos ETE 1 e ETE 2, uma OTU entre os pontos ETE 1, 2 e 3, uma OTU entre os pontos ETE 1 e ETE 4, uma OTU entre os pontos ETE 1, ETE 3 e ETE 4 e duas OTUs entre os pontos ETE 3 e ETE 4.

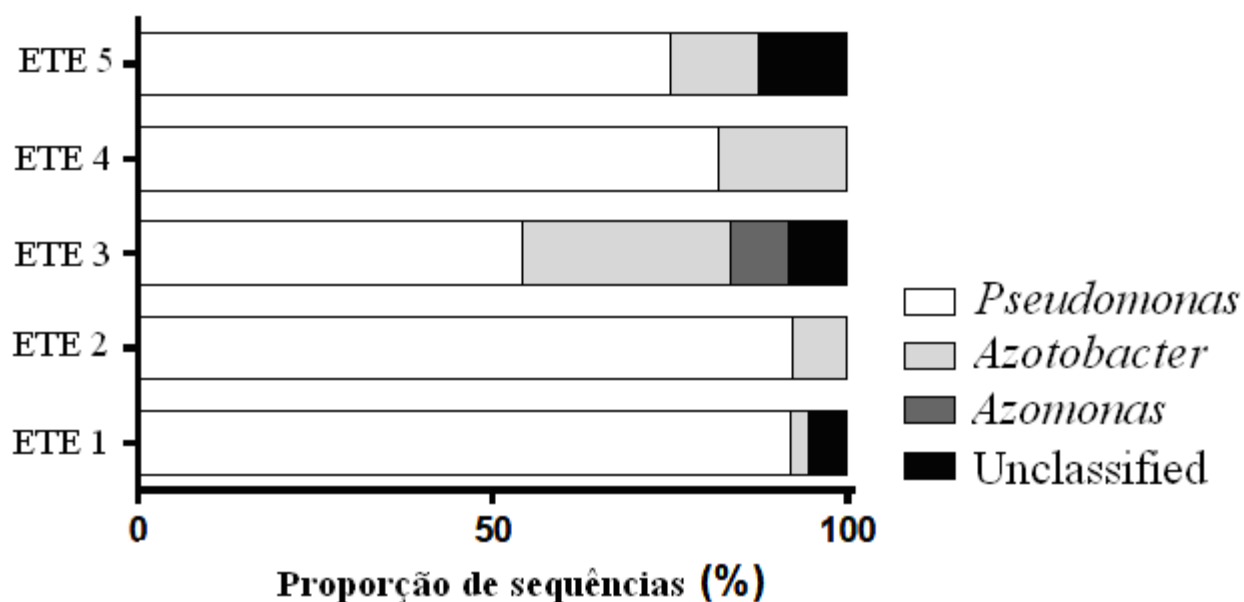


**Figura 8.** Diagrama de Venn baseado nas OTUs das bibliotecas do gene 16S rRNA de *Pseudomonas* dos pontos de coleta da ETE hospitalar

Com o objetivo de revelar quais gêneros compõem a comunidade bacteriana nos ambientes estudados, as sequências de cada biblioteca foram classificadas através da ferramenta de classificação do Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier>) (Gráfico 8).

Com o *The Classifier* (RDP-II), foram identificados um total de 3 gêneros da família Pseudomonadaceae, como mostra o gráfico 8. O gênero *Pseudomonas* é dominante em todas as comunidades bacterianas estudadas. O gênero *Azomonas* só foi encontrado no ponto ETE 3.

*Azotobacter* e *Azomonas* são descritos como gêneros contendo espécies capazes de fixar o nitrogênio em condições aeróbias (KENNEDY & RUDNICK, 2005; KENNEDY *et al.*, 2005). Há uma relação molecular do gene 16S rDNA entre os gêneros *Azotobacter*, *Azomonas* e *Pseudomonas* que apresentam entre 97-99% de similaridade, o que não permite a diferenciação entre estes gêneros.



**Gráfico 8.** Composição dos diferentes gêneros baseados na classificação das sequências parciais do gene 16S das bactérias da ETE usando a ferramenta *Classifier* do banco de dados RDP-II

#### 4.6.1. Árvore filogenética

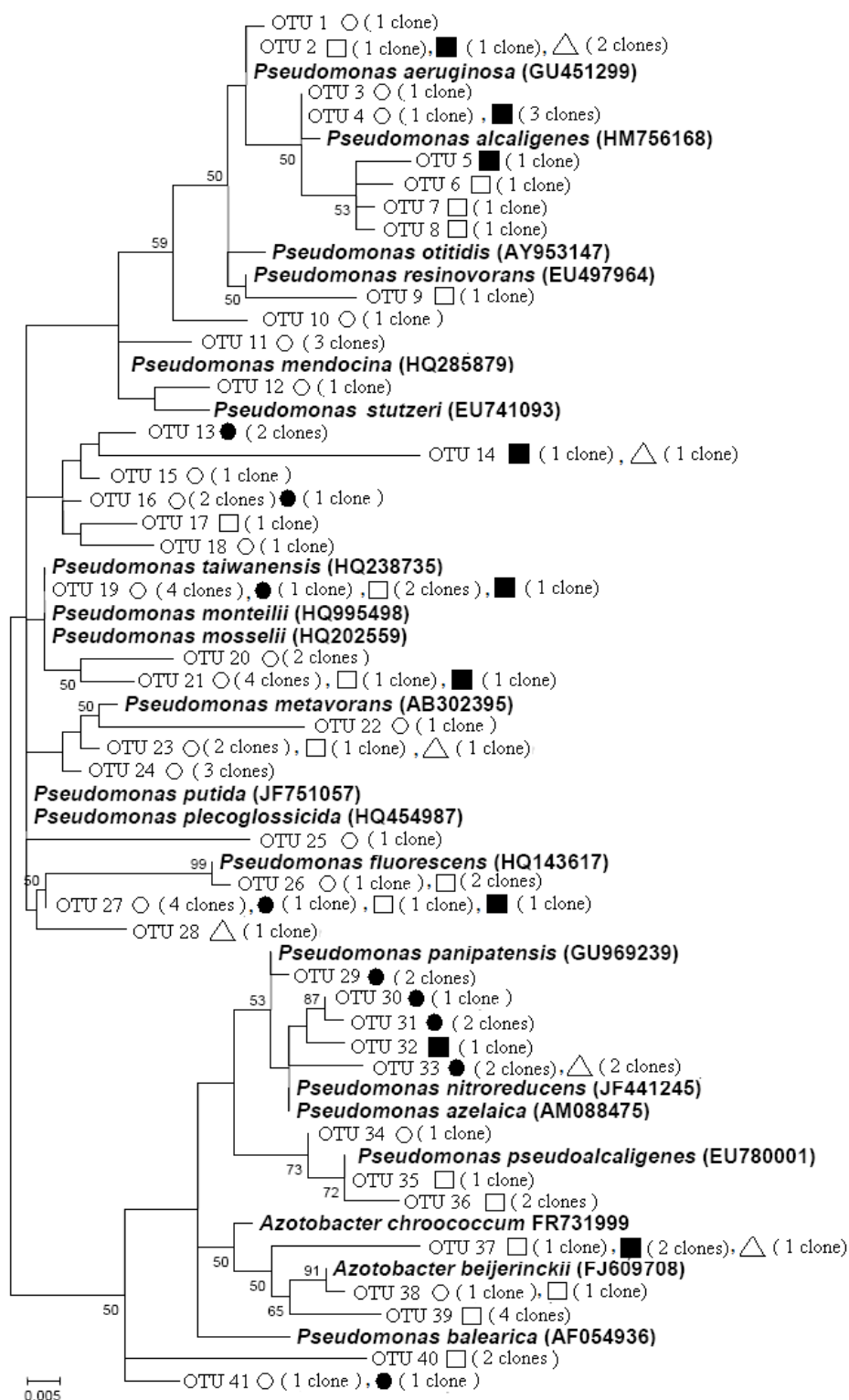
A árvore filogenética nos permitiu conhecer os filotipos bacterianos do gênero *Pseudomonas* que compõem as etapas da ETE hospitalar. Um total de 93 clones foram obtidos das 5 etapas da estação. Após o agrupamento em OTUs, foi realizada uma única construção filogenética reunindo todas as bibliotecas (Figura 9).

A análise de similaridade demonstrou a presença de 18 espécies do gênero *Pseudomonas*, sendo a espécie *P. fluorescens* a que apresentou o maior número de clones (11,8%) detectado em todas as cinco etapas da ETE. A espécie *P. alcaligenes* foi observada em três etapas do tratamento, ETE 1 (n=2), ETE 3 (n=3) e ETE 4 (n=4) com 97% de similaridade nos 3 pontos. Cinco clones (5,4%) dos pontos ETE 1, 3, 4 e 5 foram relacionadas com *P. aeruginosa* e apresentaram 98% de similaridade. Oito clones, dos pontos ETE 1 (50%), ETE 2 (12,5%), ETE 3 (25%) e ETE 4 (12,5%) foram relacionados com *P. taiwanensis*, *P. monteilii* e *P. mosselii* (98%). Sequências relacionadas com as espécies *P. nitroreducens* e *P. azelaica* apresentaram similaridade de 97% nos pontos ETE 2 (n=5), ETE 4 (n=1) e ETE 5 (n=2).

A árvore filogenética mostra que 25,8 % dos clones são afiliados a espécies bacterianas não cultivadas provenientes de pele humana, intestino, solo, lodo, planta e ar.

## LEGENDA:

- ETE 1
- ETE 2
- ETE 3
- ETE 4
- △ ETE 5



**Figura 9.** Árvore filogenética dos clones bacterianos obtidos nas bibliotecas das 5 etapas da ETE hospitalar. As seqüências de referência retiradas do banco de dados GenBank são mostradas em negrito. A topologia da árvore baseia-se na análise de neighbor joining e o *bootstrap* foi calculado com 1000 repetições. Apenas *bootstraps* > 50 são mostrados



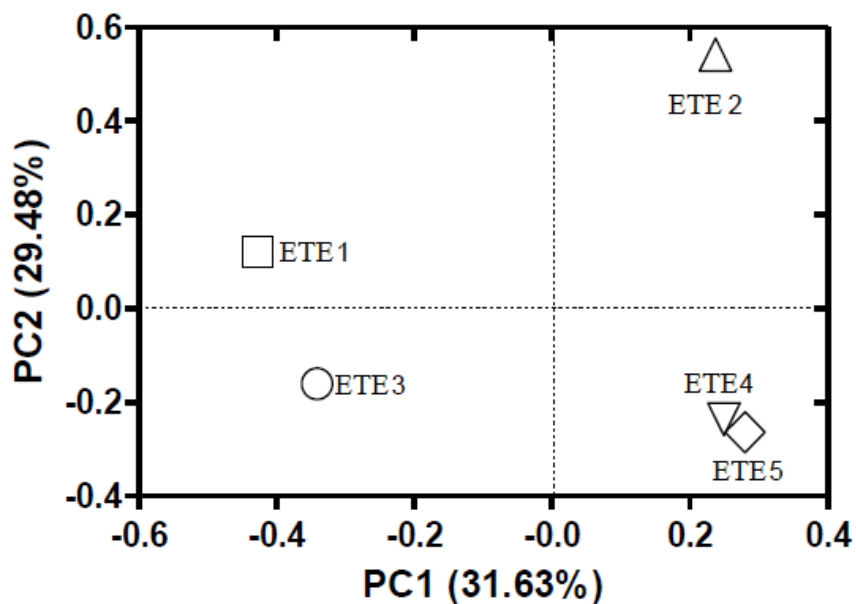
#### 4.7. Análise estatística

As análises estatísticas comparativas entre as bibliotecas, pelo programa J-LIBSHUFF, apresentaram p-values > 0,0001 demonstrando que as 5 bibliotecas analisadas não são significativamente diferentes (Tabela 6).

**Tabela 6.** Valores de 'p' calculado nas comparações entre as bibliotecas de 16S rDNA das comunidades microbianas usando o J- LIBSHUFF

<b>Comparison</b>	<b>dCXYScore</b>	<b>p -values</b>
STP 1- STP 2	0.00418290	0.0150
STP 2- STP 1	0.00081802	0.6241
STP 1- STP 3	0.00276972	0.0008
STP 3- STP 1	0.00069844	0.2938
STP 1- STP 4	0.00412569	0.0362
STP 4- STP 1	0.00099883	0.6553
STP 1- STP 5	0.00792473	0.0019
STP 5- STP 1	0.00301791	0.3393
STP 2- STP 3	0.00349881	0.1620
STP 3- STP 2	0.00581134	0.0070
STP 2- STP 4	0.00544567	0.0491
STP 4- STP 2	0.00235536	0.3047
STP 2- STP 5	0.00375129	0.0235
STP 5- STP 2	0.00079411	0.7107
STP 3- STP 4	0.00342112	0.2422
STP 4- STP 3	0.00167828	0.7470
STP 3- STP 5	0.00574625	0.1154
STP 5- STP 3	0.00100555	0.9288
STP 4- STP 5	0.00081284	0.8509
STP 5- STP 4	0.00352745	0.3972

O gráfico 9 mostra a análise de componentes principais (PCA) de comunidades bacterianas do resíduo líquido hospitalar por meio do software UniFrac (método filogenético). Pela análise do gráfico de componentes principais, as comunidades microbianas dos pontos ETE 2, 4 e 5 foram separadas dos pontos ETE 1 e 3 pelo eixo PC1. Em relação ao eixo PC2, os pontos ETE 1 e 2 foram separados dos pontos ETE 3, 4 e 5. Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas significantes nas análises comparativas, as etapas da planta de tratamento mantém alguma diversidade nas comunidades, exceto para os pontos ETE 4 e 5 que ficaram muito próximas. Através do gráfico de coordenadas principais gerado pela análise UniFrac (Gráfico 9), PC1 e PC2 explicam respectivamente 31,63% e 29,48% da variabilidade encontrada.



**Gráfico 9.** Análise de Componentes Principais (PCA) de 5 comunidades microbianas do resíduo líquido hospitalar estudado, utilizando as distâncias geradas pelo UniFrac. Os eixos são rotulados com o percentual da variação explicada por cada componente principal

## 5. DISCUSSÃO

Até recentemente não havia no Brasil uma preocupação efetiva com relação ao gerenciamento e ao descarte adequado dos resíduos gerados pelos estabelecimentos de assistência à saúde, bem como para as águas residuárias provenientes destes locais. Com o aumento da carga poluidora nos corpos hídricos e devido às condições bastante favoráveis no país à propagação de doenças veiculadas pela água, cada vez mais vem sendo enfatizada a necessidade do controle ambiental. As pesquisas estão sendo direcionadas à avaliação das características destes tipos de efluentes e dos impactos reais que o descarte inadequado, ou o não tratamento dos mesmos, poderiam gerar nos ecossistemas aquáticos.

Vários estudos indicam que o sistema de tratamento de água residual hospitalar pode criar rotas que disseminam bactérias resistentes aos antibióticos no meio ambiente (CHITNIS *et al.*, 2004; SAYAH *et al.*, 2005; KIM & AGA, 2007; PRADO *et al.*, 2008; FASIH *et al.*, 2010; ROBLEDO *et al.*, 2011). De fato, Reinthaler e colaboradores (2003) encontraram 40% de cepas de *E. coli* de esgoto, isoladas de estações de tratamento de esgoto doméstico e hospitalar, resistentes a um ou mais antibióticos e 10% resistentes a mais de três antibióticos. O comportamento de resistência dessas cepas associadas à pressão de seleção de antibióticos parcialmente metabolizado e outros compostos químicos liberados do hospital no sistema de descarga de esgoto facilita a aquisição e proliferação de características de resistência entre bactérias (KÜMMERER & HENNINGER, 2003; JACOBSEN *et al.*, 2008). Essas características de resistência adquirida podem permitir à bactéria: produzir enzimas que destroem a droga antibacteriana; expressar sistemas de efluxo; modificar o site da droga-alvo; produzir uma via metabólica alternativa que não reconhece a ação da droga (TENOVER, 2006).

No Brasil, o controle da eficiência do tratamento de micro-organismos na plantas de tratamento é realizado pela determinação de coliformes totais e fecais. Além disso, alguns estudos têm utilizado outros biomarcadores para verificar a eficiência do tratamento. Resende (2009) encontrou 10 cepas de *K. pneumoniae* provenientes das amostras de esgoto hospitalar de 10 hospitais de Goiânia, Brasil. Um estudo realizado por Abreu e colaboradores (2010) também encontrou 10 cepas de *K. pneumoniae* provenientes de amostras de efluentes do Hospital Universitário Regional de Maringá. Prado e colaboradores (2008) analisaram a eficiência de uma planta de tratamento de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro e demonstraram a presença de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes no efluente tratado. A planta foi considerada ineficiente

na remoção de micro-organismos patogênicos, permitindo a disseminação dessas bactérias no ambiente.

A *P. aeruginosa* também vem sendo utilizada como marcador e alguns estudos já demonstraram sua presença em efluentes hospitalares nas cidades de Goiânia (GO), Itajaí (SC), Porto Alegre (RS) e Rio de Janeiro (RJ). Estes estudos demonstraram cepas multidroga resistentes nos efluentes reforçando a importância do tratamento desses resíduos antes do lançamento no meio ambiente.

Recentemente, Chagas e colaboradores (2011) realizaram um estudo baseado na metagenômica em uma estação de tratamento de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro e verificaram a presença de clones que apresentaram altas similaridades com bactérias patogênicas. Dentre esses clones, 55,3% pertencem a ordem Pseudomonadales.

Considerando a relevância desse resultado, resolvemos conhecer a diversidade de *Pseudomonas* spp. e a susceptibilidade aos antimicrobianos de estação de tratamento de esgoto hospitalar como objetivo de contribuir para o controle da disseminação destes micro-organismos no ambiente. Um fato relevante foi a ausência de cepas viáveis de *P. aeruginosa* na etapa ETE 4, atribuído a adição do hipoclorito de sódio, que levou a destruição e/ou inibição de crescimento bacteriano. Embora essa inibição possa ser considerada um fator positivo no ambiente hospitalar, o mesmo não ocorre em relação ao ambiente, pois demonstramos a presença de cepas viáveis e multirresistentes na etapa seguinte que são lançadas no meio ambiente, comprometendo a saúde pública. Os resultados deste estudo indicam que células viáveis, mas não cultiváveis de *P. aeruginosa*, detectadas após a etapa de cloração estão relacionadas ao tamanho da população microbiana, células em diferentes estágios de desenvolvimento, concentração de desinfetante e alto fluxo produzindo tempos de contato curto, que corroboram para uma menor eficácia da desinfecção. Murray e colaboradores (1984) detectaram um aumento significativo no percentual de cepas resistentes à dois ou três antibióticos quando afluente foi clorado em laboratório e um aumento menor quando afluente foi comparado com efluentes tratados na planta de tratamento.

A presença de *Bacillus* sp. no ponto ETE 4 após 72 horas de incubação deve-se muito provavelmente a presença de formas esporuladas devido a alta concentração de hipoclorito de sódio nesta etapa. Esporos são invariavelmente formas mais resistentes do que as formas vegetativas, por isso são considerados alvos críticos para o processo de descontaminação.

Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram maior resistência (21,67%) no ponto ETE 1 e menor resistência (6,25%) no ponto ETE 5, a todos os antimicrobianos testados. Nós verificamos a

presença de organismos multirresistentes em isolados clínicos intrahospitais, e como esses organismos são conduzidos a estação, nós acreditamos que os mesmos exercem influência na composição do resíduo no ponto de chegada do esgoto (ETE 1) (Figura 3). Esses organismos são conduzidos a ETE hospitalar juntamente com drogas não metabolizadas, desinfetantes e outras substâncias, o que proporciona uma forte pressão seletiva favorecendo as taxas de resistência antimicrobiana (HEUER *et al.*, 2002; TENNSTEDT *et al.*, 2003; TUMÉO *et al.*, 2008). A comparação de três estações de tratamento de esgoto, duas plantas de esgoto doméstico uma de esgoto hospitalar, em relação aos níveis de resistência aos antimicrobianos demonstrou uma proporção significativamente superior de resistência a amicacina e à tetraciclina no afluente da planta do esgoto hospitalar (REINTHALER *et al.*, 2003).

Neste estudo, o aztreonam foi o antibiótico que apresentou menor susceptibilidade nos isolados da ETE hospitalar (62,9%) e nos isolados clínicos (50%), seguido de outros  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos. Altas taxas de resistência do aztreonam, além de outros lactâmicos sugerem a presença de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e/ou organismos produtores de AmpC, capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido, penicilinas e aztreonam (RUPP & FEY, 2003). O aumento da taxa de resistência ao aztreonam ocorre pela combinação de pelo menos três mecanismos: impermeabilidade da membrana externa, aumento da ação de sistemas de bombas de efluxo a multidrogas e alterações em sítios alvo ou degradação enzimática (KARLOWSKY *et al.*, 2003; SOARES, 2005).

Embora nós não tivéssemos acesso aos dados terapêuticos relativos a administração de antibióticos no hospital, nossos resultados nos levam a supor que os  $\beta$ -lactâmicos vem sendo muito utilizados neste hospital. Um estudo realizado nesta mesma estação de tratamento de esgoto em 2009 também demonstrou a presença de isolados de *P. aeruginosa* multidroga resistentes, além de um isolado resistente a todos os antimicrobianos testados (gentamicina, ciprofloxacina, cefepima, imipenem e aztreonam) (NOVAES, 2009). Nos Estados Unidos, a resistência da *P. aeruginosa* ao aztreonam tem aumentado significativamente, de 26% em 1993 para 32% em 2002 (OBRITSCH *et al.*, 2004). O alto nível de resistência ao aztreonam (50%) e ácido clavulânico/ticarcilina (43,7%) também tem sido mencionado em vários estudos com isolados nosocomiais (VAN ELDERE, 2003).

O uso indiscriminado de antibióticos leva a um significativo aumento nos níveis de resistência nas bactérias. Um maior número de bactérias produtoras de ESBL em pacientes que fizeram uso prévio de antibióticos, principalmente  $\beta$ -lactâmicos, foi verificado em comparação

com aqueles que não utilizaram antibióticos. Os autores demonstraram também que as cefalosporinas de terceira geração representam a classe mais usada de antimicrobianos em hospitais, exercendo assim um papel predominante na pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência, o que aponta para a necessidade do uso criterioso de tais antibióticos (AUGUSTI *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos demonstraram uma maior incidência de resistência aos antimicrobianos nos isolados clínicos. Este fato pode ser atribuído ao número não muito elevado de isolados analisados neste estudo e até mesmo a fatores externos como a chuva no dia da coleta que pode ter contribuído para a diluição do esgoto. Além disso, com base em perfis de susceptibilidade, nosso estudo verificou mecanismos de susceptibilidade a antibióticos diferentes entre os isolados do esgoto e do hospital. Essas diferenças podem estar associadas a várias características de exposição. Para isolados clínicos, a exposição aos antibióticos é reconhecida como o principal fator de risco para aquisição de resistência às fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos (CARMELI *et al.*, 1999; HARRIS *et al.*, 1999). Por outro lado, na estação de tratamento, desinfetantes, como triclosan e quaternário de amônio, que são amplamente utilizados em hospitais, são os substratos de sistemas de bomba de efluxo de *P. aeruginosa* (CHUANCHUEN *et al.*, 2002; TUMÉO *et al.*, 2008). Ao contrário do nosso estudo, Rothenbach (2008) constatou que as cepas de *P. aeruginosa* oriundas da ETE apresentaram maior resistência que as cepas isoladas em ambiente hospitalar. Acredita-se que o aumento da resistência bacteriana nos isolados do efluente hospitalar em relação às cepas hospitalares se deve aos mecanismos de transferência de resistência como, por exemplo, a transferência de plasmídios carreadores de genes de resistência entre bactérias presentes na planta de tratamento.

Os nutrientes também têm uma influência indireta no processo de transferência de genes resistentes por aumentarem a densidade e a atividade metabólica bacteriana. Os sólidos suspensos fornecem superfícies ideais onde os vários componentes estão concentrados, como os bacteriófagos, DNA livre e bactérias. A elevada concentração de bactérias no esgoto aumenta a possibilidade de transferência horizontal, uma vez que a probabilidade de uma bactéria doadora de genes resistentes encontrar outra receptora é maior (LORENZ & WACKERNAGEL, 1994). A pressão de seleção exerce um papel fundamental na transferência e manutenção de genes resistentes a antibióticos, bem como a disponibilidade de nutrientes e tipo de plasmídeos (SMALLA *et al.*, 2000). A aquisição de genes de resistência a antibióticos é geralmente independente da presença de antibióticos. Porém, a exposição de bactérias aos antibióticos confere

uma vantagem ecológica às cepas resistentes quando comparadas às cepas sensíveis, permitindo-as predominarem na população bacteriana. Esta situação é geralmente denominada de pressão seletiva antibiótica e pode acontecer no hospedeiro (corpo humano ou animal) em consequência da quimioterapia ou no ambiente, por exemplo, pelos resíduos de antibióticos que são lançados no esgoto.

A maioria dos estudos abordando o perfil de resistência aos antibióticos de microorganismos patogênicos têm sido direcionados para isolados clínicos, há muito poucos relatos sobre o tema em isolados ambientais, principalmente de efluentes hospitalares.

Nos últimos anos, a aplicação de técnicas moleculares para estudar sistemas naturais e ou planejados tem aumentado nossos conhecimentos sobre a grande diversidade e interação das comunidades microbianas que compõem ambientes complexos. Esses métodos têm aumentado nossa habilidade em lidar com as limitações dos métodos de cultivo tradicionais e acelerar a revelação da diversidade microbiana. Entre os métodos concebidos para se ter acesso à fisiologia e genética de organismos não cultivados, a metagenômica, análise genômica de uma população de microrganismos, emergiu como uma poderosa ferramenta (HANDELSMAN, 2004).

Nossa estratégia de utilizar a metagenômica associada ao isolamento de um bioindicador nos permitiu avaliar a diversidade, a viabilidade e a susceptibilidade aos antimicrobianos de espécies do gênero *Pseudomonas* no resíduo líquido hospitalar.

Enquanto o cultivo não apresentou células viáveis de *P. aeruginosa* na etapa da cloração, que voltaram a aparecer na fase seguinte, a análise da biblioteca gênica revelou a presença de *P. aeruginosa* não só nessa, mas nos pontos ETE 1, ETE 3 e ETE 5. Com isso, a estratégia de analisar o comportamento bacteriano durante o tratamento por diferentes metodologias, nos permitiu concluir que a *P. aeruginosa* foi um bioindicador sensível o suficiente para refletir os efeitos das condições físico e químicas da estação. A metagenômica, além de confirmar a presença de *P. aeruginosa*, revelou diversidade microbiana envolvida no metabolismo bacteriano. Vale ressaltar, que os isolados de *P. aeruginosa* da fase posterior a cloração foram resistentes a vários antibióticos levando a sugerir a presença de pressão seletiva exercida pelo cloro, conforme sugerido em um estudo anterior onde foi indicada a possibilidade da cloração alterar as populações de águas residuais e que a seleção de bactérias resistentes ao cloro podem contribuir para a dispersão de genes de resistência (MACAULEY *et al.*, 2006).

A avaliação da diversidade bacteriana nos brinquedos e no mobiliário de uma creche por métodos dependentes e independentes de cultivo, identificou bactérias viáveis em todos os objetos amostrados, sendo *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Micobacterium* spp. as mais frequentes. Por outro lado, a biblioteca genômica revelou uma dimensão inteiramente nova, incluindo cerca de 190 espécies de 15 divisões bacterianas. A comparação das sequências e a análise filogenética determinaram que o maior número de clones da biblioteca foi relacionado às espécies do gênero *Pseudomonas* (LEE *et al.*, 2007).

Apesar de vários relatos sobre a presença de *P. aeruginosa* em ETE hospitalar, um estudo recente no Brasil (CHAGAS *et al.*, 2011), utilizando abordagens microbiológica e molecular, resultou no isolamento de 221 cepas de 16 espécies, mas curiosamente não foi isolada nenhuma cepa de *P. aeruginosa* e nem de outra espécie do gênero *Pseudomonas*. Por outro lado, a biblioteca do gene 16S rRNA dos 38 clones de possíveis patógenos obtidos do efluente tratado, 21 pertencem a ordem Pseudomonadales. No estudo de Lee e colaboradores (2007), os autores também discutiram a ausência do isolamento de cepas de *pseudomonas* e concluíram que esse fato poderia ser devido aos meios de cultura utilizados pouco específicos para esse gênero.

Estes dados reforçam a idéia de que a aplicação de uma abordagem polifásica permite uma melhor investigação em ambientes potencialmente ricos em diversidade microbiana. Os métodos baseados no cultivo identificam prontamente as bactérias com requerimentos de cultivo conhecidos e esses métodos são necessários para comprovar a viabilidade dos micro-organismos no ambiente analisado e aqueles independentes de cultivo que vem revelando uma diversidade surpreendente a cada dia.

Nossos resultados revelaram uma diversidade relevante de espécies do gênero *Pseudomonas*. Das 41 OTUs utilizadas na construção do filograma, 11 são formadas por clones presentes em mais de uma etapa do tratamento, embora podemos observar pelo diagrama de Venn que as diferentes fases da estação apresentam uma pequena relação entre as comunidades das quatro etapas de ETE hospitalar. Nós acreditamos que as características físico-químicas, principalmente as mais acentuadas como a disponibilidade de oxigênio e a concentração de hipoclorito de sódio, possam ser responsabilizadas pela seletividade de cada etapa.

Outro dado bastante interessante em nossos resultados é o agrupamento das OTUs 29, 30, 31, 32 e 33 das etapas de oxigenação, decantação e do efluente tratado respectivamente, com sequências de espécies presentes em processos de biodegradação e biorremediação como *P. panipatensis* que tem sido isolada de diversos ambientes e tem potencial para degradar



diferentes xenobióticos, como por exemplo, os antibióticos (LIU *et al.*, 2005; TIROLA *et al.*, 2005); *P. nitroreducens* presente em plantas de tratamento de esgoto capaz de degradar o composto tóxico vermelho de metila, utilizando-o como única fonte de carbono (ZHANG *et al.*, 2010; ADEDAYO *et al.*, 2006) e *P. azelaica* que utiliza o 2-hydroxybiphenyl (2-HBP), como única fonte de carbono e energia, amplamente utilizado em formulações de desinfetantes e conservantes, como um intermediário na síntese de corantes, resinas e borrachas, e como um fungicida para controle de doenças pós-colheita em várias frutas (JASPERS *et al.*, 2000).

A *P. fluorescens*, que apresentou o maior número de clones detectado em todas as cinco etapas da ETE, é reconhecida na degradação de compostos não convencionais e útil na biorremediação ambiental (LOSER *et al.*, 1998; NISHIYAMA & NISHIHARA, 2002).

Conforme podemos observar no filograma, alguns clones não agruparam com sequências de organismos cultivados já descritos e com sequências depositadas nos banco de dados sugerindo a presença de novas linhagens, principalmente se considerarmos a composição complexa dos resíduos hospitalares ainda pouco explorados pelos microbiologistas.

A presença de *P. aeruginosa* multirresistentes em todas as fases da ETE hospitalar estudada nos leva a recomendar o monitoramento contínuo desses parâmetros no controle da eficiência dessas plantas. Uma outra medida que julgamos de extrema necessidade é a redução da prescrição de antibióticos, preferencialmente após a realização do antibiograma, uma vez que o uso indiscriminado dessas drogas aumenta cada vez mais a resistência aos antimicrobianos. Medidas reforçadas de higiene como lavagem das mãos, limpeza do ambiente e tratamento dos portadores assintomáticos, além do isolamento de pacientes portadores de patógenos com perfil de multidrogas resistência, também devem ser implementadas para diminuir a disseminação de micro-organismos resistentes. Estas medidas podem reduzir o tempo de internamento, as taxas de morbidade e mortalidade e conseqüentemente os custos relacionados com antimicrobianos, exames laboratoriais, profissionais de saúde e tratamento dos pacientes.

Os resultados obtidos pela metagenômica revelaram, pela primeira vez, a presença de espécies do gênero *Pseudomonas* com atividades biodegradadoras, o que demonstra a valiosa contribuição desses organismos no tratamento desses resíduos. Por outro lado, a constatação de isolados multirresistentes no efluente tratado, alerta para a necessidade de implementação e aprimoramento desses sistemas. Desta forma, poderá ser evitado o lançamento de patógenos e genes de resistência nos corpos hídricos, que podem provocar grande impacto ao ambiente e à saúde pública.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados foi possível concluir que:

- A presença de *P. aeruginosa* nas etapas da estação de tratamento do esgoto do complexo hospitalar Lourenço Jorge/Leila Diniz, confirma sua relevância como bioindicador nesse sistema.
- A detecção de cepas multirresistentes na ETE hospitalar reflete a influência da composição do resíduo na pressão seletiva e na transferência de genes de resistência.
- A ausência de crescimento bacteriano durante 72 horas de incubação (ETE 4); a presença de *Bacillus* sp. após esse período e de *P. aeruginosa* na etapa seguinte, demonstrou a presença de atividade bactericida e bacteriostática do hipoclorito de sódio do tratamento terciário do esgoto.
- A presença de cepas de *P. aeruginosa* resistentes no efluente tratado indica que, embora eficiente na eliminação das células, o tratamento não foi suficiente na eliminação de patógenos e alertam para os riscos à população.
- O acentuado decréscimo da susceptibilidade ao aztreonam nos isolados clínicos e da ETE hospitalar sinaliza transferência lateral de genes de resistência.
- As reduzidas taxas de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados hospitalares e nos isolados da ETE hospitalar alertam para a necessidade de maior controle no uso de antibióticos.
- A metagenômica demonstrou a presença de muitas espécies envolvidadas em processos de biodegradação que geram um impacto positivo para o processo e para o meio ambiente.
- Este estudo revelou dados ainda não divulgados na literatura e colabora significativamente para a elucidação do comportamento das comunidades de *Pseudomonas* spp. no tratamento do resíduo líquido hospitalar.
- Nossos resultados certamente irão contribuir com a Vigilância Sanitária Ambiental no que se refere ao desenho de ações preventivas aos impactos desses efluentes no ambiente e na saúde pública.

## REFERÊNCIAS

- ABESSA, D. Verão poluído. 2002. Disponível em: <<http://waves.terra.com.br/surf/noticia/verao-poluido/3627>>. Acesso em: 19 maio 2010.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Transporte terrestre de produtos perigosos: terminologia**. Rio de Janeiro: 1989. (NBR 7.501)
- ABREU, E.T. et al. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. **Acta Scientiarum Technology**, v.32, n.1, p.1-5, 2010.
- ADEDAYO, O. et al. Decolourization and detoxification of methyl red by aerobic bacteria from a wastewater treatment plant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 545-550, 2006.
- AESCHLIMANN, J. R. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. **Pharmacotherapy**, v.23, n.7, p. 916-926, Jul. 2003.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, Sep.1997.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological and Molecular Biology Reviews**, v. 59, n.1, p.143-169, Mar. 1995.
- ANZAI, Y. et al. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n. 50, n. 4, p. 1563–1589, July 2000.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 1995. 1134p.
- ARAKAWA, Y. et al. Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 40-43, Jan. 2000.
- ARMOND, G. A.; AMARAL, A. F. H. Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde (Lixo Hospitalar). In: MARTINS, M. A. **Manual de Infecção Hospitalar – Epidemiologia, Prevenção e Controle**. 2. ed. Medsi Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, Cap.54, p.734, 2001.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity. In: ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, 1998, 27-57 p.

AUGUSTI, G.R.; SUPERTI,S.; ZAVASKI, A.P. Prevalência de produção de beta-lactamases de espectro estendido em bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Scientia Medica**, v. 17, n. 4, p. 192-196, Out./Dez. 2007.

BHATTACHARYA, D. et al. Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n.3, p. 1435–1441, Mar. 2003.

BIDONE, F.R.A. **Resíduos sólidos provenientes de coletas especiais: eliminação e valorização**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde**. Brasília, 2006. 12 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

\_\_\_\_\_. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 dez. 2004.

BRASIL. Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set.1990. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L8080.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm)>. Acesso em: 12 dez.2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Parecer Técnico nº 003**, de 11 de janeiro de 2011. Brasília, 2011.

BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8 ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1974. 217p.

CARMELI, Y. et al. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, n. 43, v.6, p.1379-82, Jun.1999.

CHAGAS, T.P.G. et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Appl. Microbiol.** Epub ahead of print. Jun. 2011.

CHITNIS, V. et al. Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. **Water Research**, v. 38, n.2, p. 441-447, Jan. 2004.

CHUANCHUEN, R.; NARASAKI, C.T.; SCHWEIZEN, H. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of Triclosan. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 18, p. 5036-5044, Sep. 2002.

CLEMENTINO, M.M. et al. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n.1, p. 141-151, Jul. 2007.

\_\_\_\_\_ et al. Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. **Extremophiles**, v. 12, n. 4, p. 595-604, Jul. 2008.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute - M100-S18, **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; approved standard -18th informational supplement (M100-S18)**. Wayne, PA-USA, 2008.

COELHO, H. Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. **Bol. Pneumol. Sanit.**, v.9, n.2, Rio de Janeiro, Dez. 2001.

COLE, J.R. et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n.1, p. 294-296, Jan. 2005.

CONAMA. (Brasil). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 18 março 2005.

\_\_\_\_\_ Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 04 maio 2005.

COSTA, L.L. et al. Eficiência de Wetlands construídos com dez dias de detenção hidráulica na remoção de colílagos e bacteriófagos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v.3, n.1, primeiro semestre 2003.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, n. 5418, p.1318-1322, May 1999.

COWAN, D. et al. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 321-329, Jun. 2005.

DAMS, E. et al. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 87-173, 1988.

DAVIS, B. D. **Microbiologia. Infecções Bacterianas e Micóticas**. São Paulo: Edart, 1973. 3v, Cap. 24 e 26.

DIÁRIO OFICIAL DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO. **Programa Especial e Permanente de Fiscalização do Sistema de Tratamento de Esgotos de Hospitais e Clínicas criado pelo Decreto nº. 19.789/2001**. Decreto nº. 21.006/02. D.O., Ano XV, n. 210, 23 de janeiro de 2002.

DOWER, W.J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res.**, v .16, n.13, p- 6127-6145, Jul. 1988.

DREMONT, C.; HADJALI, J. La gestion des effluents liquides en Milieu Hospitalier. Projet DESS "Technologies Biomédicales Hospitalières", Université de Technologie de Compiègne, 1997, p. 30. Disponível em: <[http://www.utc.fr/~farges/DESS, TBH/96-97/Projects/EL/EL.htm](http://www.utc.fr/~farges/DESS_TBH/96-97/Projects/EL/EL.htm)>. Acesso em: 19. Maio 2010.

DUPRÉ, J.; O'MALLEY, A. Metagenomics and biological ontology. **Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.**, v. 38, n. 4, p.834-846, Dec. 2007.

ELKIN, S.; GEDDES, D. Pseudomonal infection in cystic fibrosis: the battle continues. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 1, n. 4, p. 609–618, Dec. 2003.

EMMANUEL, E. et al. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. **Journal of Hazardous Materials**, v. 117, n.1, p. 1-11, Jan. 2005.

ESTABELECIMENTO de saúde. Ministério da Saúde, Brasília. 2011. Disponível em: <[http://cnes.datasus.gov.br/cabecalho\\_reduzido.asp?VCod\\_Unidade=3304552270609](http://cnes.datasus.gov.br/cabecalho_reduzido.asp?VCod_Unidade=3304552270609)>. Acesso em: 05 jul. 2011.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1988. 575 p.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v.8, n.3, p.175-185, Mar. 1998.

FALAGAS, M. E.; KOLETZI, P. K.; BLIZIOTIS, I. A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1619-1629, 2006.

FASIH, N. et al. Clonal dissemination of vanA positive *Enterococcus* species in tertiary care hospitals in Karachi, Pakistan. **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 60, n.10, p. 805-809, Oct. 2010.

FORMAGGIA, D. M. E. **Resíduos de serviço de saúde**. In: Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. São Paulo: CETESB, 1994, p. 1-9.

FUENTEFRIA, D.B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.41, n.5, p. 470-473, set.-out. 2008.

GALES, A.C.; REIS, A.O.; JONES, R.N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.1, p. 183-190, Jan. 2001.

GARCIA, L.P.; ZANETTI-RAMOS, B.G. Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde: uma questão de biossegurança. **Cad. Saúde Pública**, v.20, n.3, p. 744-752, Maio/Jun. 2004.

GILLARDI, G. L. **Medical Microbiology**. In: SABATH, L. D. *Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes, and their treatment*. Vienna, Hans Huber Publishers. p. 25-30. 1980.

GIOVANNONI, S. J. et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**, v. 345, p. 60-63, May 1990.

GREEN, B. D.; KELLER, M. Capturing the uncultivated majority. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n.3, p 236–240, June 2006.

GROBKOPF, R.; JANSSEN, P.H.; LIESACK, W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence Retrieval. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n.3, p. 960-969, Mar. 1998.

GUILHERM, P. E. Caracterização de efluentes. São Paulo: CETESB, 1993.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n.10, p.245-249, Oct. 1998.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n.4, p. 669-685, Dec. 2004.

\_\_\_\_\_ How to find new antibiotics: metagenomics could be the way to mine the soil beneath our feet. **The Scientist**, v.19, n.19, p.10, Oct. 2005.

HARRIS, A. et al. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin. Inf. Dis.**, n. 28, v.5, p. 1128–1133, May 1999.

HATTORI, T. et al. **Analysis of the bacterial community according to colony development on solid media**. In: Microbial communities, Functional, Versus and Structural approaches. Insam, H. and Rangger, A. (Editors). Springer-Verlag. Berlin Hiedelberg. New York. 229-235p. 1997.

HEUER, H. et al. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, n. 2, p. 289-302, Jan. 2002.

HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v.20, n.14, p. 2317-2319, Apr. 2004.

HUGH, R.; LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. **Journal Bacteriology**, v. 66, n. 1, p. 24-26, July 1953.

HURST, C.J. et al. **Manual of Environmental Microbiology**. 2 ed. Washington: ASM Press, 2002. 1138.

JACOBSEN, A. L. et al. Comparative community physiology: non-convergence in water relations among three semi-arid shrub communities. **New Phytologist**, v. 180, n.1, p. 100-113, 2008.

JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients. **Pediatric Infectious Disease**, v. 6, n.4, p. 344-351, Apr. 1987.

JASPERS, M.C. et al. HbpR, a new member of the XylR/DmpR subclass within the NtrC family of bacterial transcriptional activators, regulates expression of 2-hydroxybiphenyl metabolism in *Pseudomonas azelaica* HBP1. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 2, p.405-17, Jan. 2000.

JOHNSEN, K.; ANDERSEN, S.; JACOBSEN, C. S. Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas* biovars. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 62, n.10, p. 3818–3825, Oct. 1996.

KARLOWSKY, J.A. et al. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n.5, p. 1681 - 1688, May 2003.

KENNEDY, C.; RUDNICK, P. Genus II. *Azomonas* Winogradsky 1938, 391. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – The Proteobacteria*, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 379–384. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer, 2005.

KENNEDY, C. et al. Genus III. *Azotobacter* Beijerinck 1901, 567AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – The Proteobacteria*, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 384–402. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer, 2005.

KERSTERS, K. et al. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. **Syst. Appl. Microbiol.**, n. 19, n.4, p. 465–477, 1996.

KIM, S.; AGA, D. S. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. **J. Toxicol. and Environ. Health**, v. 10, n.8, p. 559–573, Dec. 2007.



KIMURA, M.A. A simple method for estimating evolutionary rates of bases substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, n. 2, p. 111-120, Dec. 1980.

KIYOHARA, H.; NAGAO, K.; YANA, K. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 43, n.2, p. 454-457, Feb. 1992.

KOWALCHUK, G. A. et al. **Molecular microbial ecology manual** (2 ed., vols. 1 and 2). London: Kluwer Academic Publishers, 2004.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n.1, p. 5-7, Jun. 2003.

KÜMMERER, K.; HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. **Clin. Microbiol. Inf.**, v. 9, n.12, p.1203-1214, Dec. 2003.

KUSKE, C.R.; BARNS, S.M.; BUSCH, J.D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3614-3621, Sep. 1997.

LAGATOLLA, C. et al. Endemic carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- $\beta$ -lactamase determinants in European hospital. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.3, p. 535-538, Mar. 2004.

LAL, B.; KHANNA, S. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 81, n.4, p. 355-362, Mar. 1996.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, p. 115-175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley. 1991.

LA ROSA, A.M.F. et al. Gestão de efluentes de serviços de saúde em Porto Alegre. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 17., 2000, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: ABES, 2000. Disponível em: <[www.bvsde.paho.org/bvsaidis/impactos/vi-037.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/impactos/vi-037.pdf)>. Acesso em: 01 mar. 2011.

LEE, L.; TIN, S.; KELLEY, S. T. Culture-independent analysis of bacterial diversity in a child-care facility. **BMC Microbiology**, v. 7, v.27, p.1-13, Apr. 2007.

LEPRAT, E. Les effluents liquides hospitaliers: vers une meilleure maîtrise. **3ème Journée du réseau régional d'hygiène de Basse-Normandie**. Résumés des intervention, 1999, p.2. Disponível em: <<http://www.pharmacie.unicaen.fr/rrh/resj3/Res2.htm>>. Acesso em: 19 maio 2010.

LEVITSKI-HEIKKILA, T.V.; ULLIAN, M. E. Peritonitis with multiple rare environmental bacteria in a patient receiving long-term peritoneal dialysis. **Am. J. Kidney Dis.**, n. 46, n. 6, p. e119–124, Dec. 2005.

LIU, Z.P. et al. *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, n.3, p. 1229–1232, May 2005.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Disease**, v. 34, n.5, p. 634–640, Mar. 2002.

LÓPEZ-ROMALDE, S. et al. Existence of two O-serotypes in the fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica*. **Vet. Microbiol.**, v. 94, n.4, p. 325–333, July 2003.

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

LOSER, C. et al. Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, n.5, p. 631–636, 1998.

LOZUPANE, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R. UniFrac – An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. **BMC Bioinformatics**, n. 7, v. 371, Aug. 2006.

MACAULEY, J.J. et al. Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. **Water Res.**, v. 40, n.10, p. 2017–2026, Jun. 2006.

MARRA, A.R. **Análise dos fatores de risco relacionados à letalidade das infecções da corrente sanguínea hospitalares por *Klebsiella pneumoniae***. São Paulo: UNIFESP, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

MARTINS, S. T. **Análise de Custos da Internação de Pacientes em Unidades de Terapia Intensiva com Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes**. São Paulo: UNIFESP, 2002. 124p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

MCQUILLIAN, D. et al. Drug Residues in Ambient Water: Initial Surveillance in New Mexico, USA. In: ANNUAL NEW MEXICO ENVIRONMENTAL HEALTH CONFERENCE, 7., 2002, Albuquerque, New Mexico, **Anais**. New Mexico: p.28–30.

MISHRA, S. et al. Field study: in situ bioremediation of oily sludge contaminated land using oilzapper. In: PROCEEDINGS OF HAZARDOUS AND INDUSTRIAL WASTES. Pennsylvania: 1999, p. 177–186.

MURRAY, G.E. et al. Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 48, n.1, p. 73–77, Jul. 1984.

NISHIYAMA, N.; NISHIHARA, S. Biodegradation of dodecyltrimethylammonium bromide by *Pseudomonas fluorescens* F7 and F2 isolated from activated sludge. **Microbes and Environments**, v. 17, n. 4, p.164-169, Jul. 2002.

NOVA Maternidade Leila Diniz atende na Zona Oeste. **O DIA**, Rio de Janeiro, 17 jan. 2008. Disponível em: <<http://odia.terra.com.br>>. Acesso em: 01 set. 2010.

NOVAES, R.M.P. **Avaliação da Eficiência de uma Estação de Tratamento de Efluente Hospitalar através da Detecção e Caracterização Molecular de *Pseudomonas aeruginosa* na Cidade do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. 51p. Trabalho de conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro.

NOUÉR, S. A. et al. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3663-3667, Sep. 2005.

OBRITSCH, M.D. et al. Nation surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care units patients from 1993 to 2002. **Antimicrob. Agent Chemother.**, v. 48, n.12, p. 4606-4610, Dec. 2004.

OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **J. Microbiol. Methods**, v. 7, n.1-2, p. 57–66, Dec. 1987.

O'MAHONY, M.M. et al. The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil. **Chemosphere**, v. 63, n.2, p. 307–314, Apr. 2006.

ONACA, C. et al. Degradation of alkyl methyl ketones by *Pseudomonas veronii* MEK700. **J. Bacteriol.**, v. 189, n.10, p. 3759–3767, May 2007.

OYAIZU, H.; KOMAGATA, K. Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, n. 29, p.17–40, 1983.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, n. 5313, p.734-740, May 1997.

PALLERONI, N. J. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, pp. 141–199. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.

\_\_\_\_\_ *Pseudomonas classification*. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 64, n. 3-4, p. 231–251, 1993.

PAVIANI, E.R.; STADNIK, C.B.; HEINEK, I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade de *P. aeruginosa*. **Infarma**, v.15, n.12, p.66-70, Jan. 2004.

PELLEGRINO, F. L. P. C. et al. Occurrence of a multirug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Clinical Microbiology**, v. 40, n.7, p. 2420-2424, July 2002.

PEREIRA, R.M. et al. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 439- 447, Oct. 2006.

PITOUT, J. D.D. et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-lactamases in a large centralized laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.7, p. 3129–3135, July 2005.

POIREL, L.; COLLET, L.; NORDMANN, P. Carbapenem hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. **Emerging Infectious Disease**, v. 6, n.1, p. 84-85, Jan.-Feb.2000.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MANDELL, G.L.; BENNETH, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 1980-2003.

\_\_\_\_\_ *Pseudomonas aeruginosa*. In: MANDELL, G.L.; BENNETH, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 2310-2335.

PRADO, T. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n.1, p. 136- 141, Jan. 2008.

PRAKASH, O.; KUMARU, K.; LAL, R. *Pseudomonas delhiensis* sp. nov., from a fly ash dumping site of a thermal power plant. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, p. 527–531, Mar. 2007.

QUINTEIRA, S.; PEIXE, L. Multiniche screening reveals the clinically relevant metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* far from the hospital setting: an ongoing dispersion process. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n.5, p.3743-3745, May 2006.

REINTHALER, F. F. et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. **Water Research**, v. 37, n.8, p.1685–1690, Apr. 2003.

REIS, A. O. **Análise do perfil de sensibilidade da similaridade genética e da resistência aos carbapenems em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa***. São Paulo: UNIFESP, 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

RESENDE, A.C.B. et al. Detection of antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in hospital effluents and in the sewage treatment station of Goiânia, Brazil. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, p.385-391, Oct. - Dec. 2009.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, v.38, p. 525-552, Dec. 2004.

RIO DE JANEIRO (ESTADO). Lei nº 2.661, de 27 de dezembro de 1996 que regulamenta o disposto no art. 274 da Constituição do Estado do Rio de Janeiro no que se refere à exigência de níveis mínimos de tratamento de esgotos sanitários, antes de seu lançamento em corpos d'água e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro**, 30 de dezembro de 1996.

ROBLEDO, I.E.; AQUINO, E.E.; VÁSQUEZ, G.J. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 6, p. 2968-2970, Mar. 2011.

ROCHENBACH, G.C. **Avaliação do perfil e da resistência bacteriana no efluente de um hospital em Itajaí/ Santa Catarina**. Itajaí: UNIVALI, 2008. 111p. il. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Santa Catarina.

RUPP, M.E.; FEY, P.D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Drugs**, v. 63, n. 4, p. 353– 365, 2003.

SADER, H. S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 5. n.4, p. 200-214, Aug. 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n.4, p. 406-425, July 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **In: Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, 2, 3, 1989.

SANTOS, M. A. S. P. et al. Qualidade da Água: estudo de casos, Sistema Rio Grande X Sistema Rio Claro. In: XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 13, 1999, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: ABRH, 1999.

SANTOS, L. F. et al. Determinação da produção de metalo- $\beta$ -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 4, p. 291-296, Mar. 2002.

SARDELIC, S. et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying vim-2 metallo- $\beta$ -lactamase determinants, Croatia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 1022-1023, Aug. 2003.

SAYAH, R.S. et al. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. **App. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 3, p. 1394-1404, Mar. 2005.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, n.3, p.303-310, Jun. 2003.

SCHLOSS, P.D. et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n.23, p.7537-7541, Dec. 2009.

SHUQAIR, N. S. M. S. A.Q. **A Política de Vigilância Sanitária de Medicamentos: Um estudo de caso na região da Lapa – Município de São Paulo**. São Paulo: USP, 1996. 109p. Dissertação – Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.

SILVA, C. H. P. M. **Bacteriologia: Um texto ilustrado**. Ed. Eventos, 1999.

SILVA, G.C. **Manejo e descarte de resíduos laboratoriais. Estudo e levantamento de dados de Laboratórios Analíticos**. ANVISA, 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/reblas/procedimentos/manejo.pdf>>. Acesso em: 27 mar .2010.

SILVEIRA, E.L. et al. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, n.10, p.1507-1516, Oct. 2006.

SINGLETON, D.R. et al. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **App. Environ. Microbiol.**, v.67, n.9, p.4374-4376, Jun. 2001.

SMALLA, K. et al. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 74, n.1, p. 78–85, Jan. 1993.

\_\_\_\_\_ Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n.11, p. 4854–4862, Nov. 2000.

SNEATH, P. H. A.; STEVENS, M.; SACKIN, M. J. Numerical taxonomy of *Pseudomonas* based on published record of substrate utilization. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 47, n.5, p. 423–448, Dec. 1981.

SOARES, M.C.S.T. **Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói - RJ.** Niterói: UFF, 2005. 77p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Federal Fluminense, Curso de Pós-Graduação em Patologia, Niterói.

SOUZA, E.L. Contaminação ambiental pelos resíduos de serviços de saúde. **Revista Fafibe on-line**, ano 2, n.2, maio 2006. Disponível em: <[http://www.fafibe.br/revistaonline/arquivos/eduardo\\_contaminacaoambiental.pdf](http://www.fafibe.br/revistaonline/arquivos/eduardo_contaminacaoambiental.pdf)>. Acesso em: 07 abril 2010.

SPIERS, A.J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, v. 146, p. 2345-2350, Oct. 2000.

SPIPKER, T. et al. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.5, p. 2074-2079, May 2004.

STOLZ, A.; BUSSE, H.J.; KAMPFER, P. *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, n.3 p. 572–576, Mar. 2007.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.** Epub ahead of print. May 2011.

TENNSTEDT, T. et al. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n.3, p. 239 - 252, Aug. 2003.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n.6, s.1, p. S3–S10, Jun. 2006.

THOMPSON, J.D. et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, Dec. 1997.

TIIROLA, M. A et al. *Novosphingobium lentum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from a polychlorophenol bioremediation process. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, n.2, p. 583–588, Mar. 2005.

TODAR, K. Textbook of Bacteriology. **The Microbial World**. In: University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, 2002. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net>>. Acesso em: 31 mar. 2010.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Ed.Art Med, 2005. 597p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUN, F. **Microbiologia**. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ed.Atheneu, 2004.

TRINGE, S.G. et al. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, v. 308, n.5721, p. 554–557, Apr. 2005.

TUMÉO, E. et al. Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients recovered in the hospital effluents? **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 211, v. 1-2, p. 200-204, Mar. 2008.

TURQUE, A.S. et al. Environmental shaping of sponge associated archaeal communities. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e.15774, Dec. 2010

VAL-MORAES, S. P. et al. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n.1, p.7-16, Jan.-Mar. 2009.

VANCANNEYT, M. et al. Fatty acid content in whole-cell hydrolysates and phospholipid fractions of pseudomonads: a taxonomic evaluation. **Syst. Appl. Microbiol.**, n.19, p. 528-540, 1996.

VAN ELDERE, J. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, n.2, p.347-352, Jan. 2003.

VASIL, M.L. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence epidemiology. **The Journal of pediatrics**, v. 108, n.5, p. 800-805, May 1986.



VECCHIA, A.D. et al. Diagnóstico sobre a situação do tratamento do esgoto hospitalar no Brasil. **Revista Saúde e Ambiente**, v.10. n. 2, p.65-70, Nov. 2009.

VEIRA, R.P. et al. Archaeal communities in a tropical estuarine ecosystem: Guanabara Bay, Brazil. **Microb. Ecol.**, v. 54, n.3, p. 460-468, Oct. 2007.

VISCA, P. et al. Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. **Applied Environment Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2886-2893, Sep. 1992.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3 ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005. 1v.

WHYTE, L.G. et al. Bioremediation treatability assessment of hydrocarbon-contaminated soils from Eureka, Nunavut. **Cold Regions Sci. Technol.**, v. 32, n.2-3, p. 121–132, Sep. 2001.

WOESE, C.R. et al. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. **Microbial Rev.**, v. 47, n. 4, p. 621-669, Dec. 1983.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbial Rev.**, v. 51, n. 2, p. 221-271, June 1987.

ZHANG, H. et al. Development of an autofluorescent *Pseudomonas nitroreducens* with dehydrochlorinase activity for efficient mineralization of gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-HCH). **J. Biotechnol.**, v.146, n. 3, p.114-9, Apr. 2010.

## ANEXO A - MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

### 1. Caldo Nutriente

Cloreto de sódio.....5g  
Peptona.....10g  
Extrato de carne .....3g  
Água destilada q.s.p.....1000 mL

- Pesar cada um dos reagentes separadamente.
- Verter os reagentes no erlenmeyer solubilizando-os com água sob a placa de agitação e aquecimento, até o volume final de 1000 mL.
- Ajustar o pH para 7,4 com NaOH ou HCl.
- Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

### Inoculação e cultivo

- O meio líquido será distribuído no volume de 5 mL em tubos de ensaio 18x160mm.
- A inoculação e semeadura serão realizadas em capela de fluxo laminar.

### 2. Ágar Nutriente

Cloreto de sódio.....5g  
Peptona.....10g  
Extrato de carne.....3g  
Ágar.....20g  
Água destilada q.s.p.....1000 mL

- Pesar cada um dos reagentes separadamente.
- Verter os reagentes no erlenmeyer solubilizando-os com água sob a placa de agitação e aquecimento, até o volume final de 1000 mL.
- Solubilizar por último o ágar.
- Ajustar o pH para 7,4 com NaOH ou HCl.
- Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

### **Inoculação e cultivo**

- O meio sólido será distribuído no volume de 20 mL em placas de Petri.
- A inoculação e semeadura serão realizadas em capela de fluxo laminar.

### **3. Ágar Cetrímide**

**Finalidade:** O ágar cetrímide é um meio seletivo utilizado para isolamento e identificação de *P. aeruginosa*. Outras bactérias são inibidas pelo composto cetrímide (brometo e cetilamônio). O resultado positivo indica o crescimento da cepa com produção de pigmento azul, azul-esverdeado, amarelo-esverdeado ou sem pigmento.

#### **Preparo**

Peptona .....	20g
Cloreto de magnésio.....	14g
Sulfato de potássio.....	10g
Cetrímide.....	0,3g
Ágar .....	13,6g
Glicerol.....	10 mL
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

- Suspende os componentes em água destilada.
- Dissolver por aquecimento à ebulição.
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.
- Resfriar a 50°C.
- Distribuir em placas de Petri (15x100mm). pH final = 7,1 ± 0,2.

### **4. Ágar Muller Hinton**

Preparado de acordo com as instruções do fabricante. pH final = 7,3 ± 0,1.

Distribuído 20 mL em cada placa de Petri (15x100mm).

## 5. Ágar Luria Bertani (LB)

**Finalidade:** O ágar Luria Bertani é utilizado para o cultivo e manutenção de cepas recombinantes de *Escherichia coli*. Pode ser usado para o isolamento de rotina e cultivo de micro-organismos particularmente não fastídicos.

### Preparo

Triptona.....	10g
Cloreto de sódio.....	5g
Extrato de levedura.....	5g
Ágar.....	15g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

- Pesar a triptona, o cloreto de sódio e o extrato de levedura.
- Verter esses reagentes no erlenmeyer solubilizando-os com água destilada sob a placa de agitação e aquecimento, até o volume final de 1000 mL.
- Adicionar 15g de ágar e solubilizar.
- Ajustar o pH final para:  $7,5 \pm 0,2$
- Autoclavar à 121°C durante 15 minutos.
- Resfriar a 50°C.
- Distribuir em placas de Petri (15x100mm).

## 6. Caldo Luria Bertani (LB)

### Preparo

Triptona.....	1g
Cloreto de sódio.....	1g
Extrato de levedura.....	0,5g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

- Pesar a triptona, o cloreto de sódio e o extrato de levedura.
- Verter esses reagentes no erlenmeyer solubilizando-os com água destilada sob a placa de agitação e aquecimento, até o volume final de 1000 mL.
- Ajustar o pH final para:  $7,5 \pm 0,2$
- Autoclavar à  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.
- Resfriar a  $50^{\circ}\text{C}$ .

## ANEXO B - PROVAS BIOQUÍMICAS

### 1. Método de Gram:

**Finalidade:** A coloração de Gram é muito utilizada em bacteriologia permitindo a distinção entre bactérias Gram positivas e Gram negativas. A diferença entre os dois tipos de células relaciona-se com a estrutura da parede celular das bactérias. Assim a parede celular de bactérias Gram positivas é formada por uma camada espessa de peptidoglicano, enquanto que a parede celular de bactérias Gram negativas é formada por uma camada fina de peptidoglicano, rodeada por uma camada externa de lipopolissacarídeo e proteína. Diferenças na permeabilidade destas membranas aos reagentes químicos levam a diferenças de coloração. Na técnica de Gram utiliza-se primeiro um corante básico, o cristal violeta, seguido de um mordente, o iodo de Gram que aumenta a afinidade da célula para o corante. O cristal violeta mais o lugol formam um complexo insolúvel (pararosanilina) no interior das células. Após é adicionado um agente descolorante, o álcool a 95%, que remove o corante, e finalmente um segundo corante básico, a fucsina. As células que retêm o primeiro corante chamam-se Gram positivas e as que descoram ficarão coradas pelo segundo corante, são as Gram negativas. Nas Gram negativas, o solvente álcool ou acetona remove a membrana externa da parede destas bactérias, e como a camada de mucocomplexo é pouco espessa não consegue reter o corante violeta de cristal que é assim retirado da célula por lavagem.

### Preparo dos reagentes

#### Cristal Violeta (Seg. Hucker)

##### Solução A:

Cristal violeta..... 2g  
Álcool etílico q.s.p.....20 mL

##### Solução B:

Oxalato de amônio..... 0,8g  
Água destilada q.s.p ..... 80 mL

- Misturar as soluções A e B.
- Deixar em repouso por 24 horas.
- Filtrar em papel whatman nº 1.
- Armazenar em frasco escuro.

### **Solução de Lugol**

Iodo..... 1g  
 Iodeto de potássio .....2g  
 Água destilada q.s.p ..... 300 mL

- Macerar o iodo e o iodeto de potássio em um gral.
- Adicionar água aos poucos e misturar bem. Completar o volume com água destilada.
- Armazenar em frasco escuro.

### **Descorante**

Agente intermediário: álcool - acetona (100 mL de álcool etílico 95% e 100 mL de acetona)

Misturar e guardar em frasco escuro.

### **Fucsina Fenicada (Seg. Ziehl)**

Fucsina básica..... 1g  
 Álcool etílico 95% ..... 10 mL  
 Fenol fundido.....5g  
 Água destilada q.s.p.....100 mL

- Dissolver em um gral a fucsina no álcool.
- Acrescentar aos poucos o fenol.
- Homogeneizar até completa dissolução.
- Completar o volume com água para 100 mL.
- Filtrar após 24 horas de repouso.
- Guardar em frasco escuro.

**Procedimento:**

- Fixar o esfregaço bem homogêneo ao calor (bico de bunsen).
- Cobrir o esfregaço com solução de cristal violeta por 1 minuto.
- Escorrer o corante e cobrir durante 1 minuto com solução de lugol.
- Lavar em água corrente.
- Descorar com álcool-acetona.
- Lavar a lâmina rapidamente com água corrente.
- Cobrir o esfregaço com fucsina e deixar corar por trinta segundos com fucsina de Ziehl.
- Lavar em água corrente.
- Deixar secar.
- Pingar na lâmina 1 gota de óleo mineral e observar ao microscópio.

**Interpretação:**

Micro-organismos Gram positivos: cor roxa

Micro-organismos Gram negativos: cor rosa

**2. Teste da oxidação - fermentação da glicose (OF glicose)**

**Finalidade:** Detecção da produção de ácidos como produtos do metabolismo oxidativo da glicose. Difco<sup>TM</sup> OF Basal Medium - Preparado de acordo com as instruções do fabricante. Após a autoclavação acrescentar 1% do carboidrato desejado que deverá ser preparado separadamente e esterilizado por filtração (membrana 0,22 µm).

**Inoculação e Incubação:**

- Inocular 2 tubos com a cultura pura de 18-24 horas de incubação.
- Semear por picada central atingindo até uma profundidade de 1 cm.
- Acrescentar 0,5 mL de óleo mineral estéril em um dos tubos inoculados.
- Incubar a 35-37°C por 24 horas.



**Interpretação:**

**Teste positivo:** Oxidador: tubo aberto: amarelo; Tubo fechado: inalterado (verde)

Fermentador: Tubos fechado e aberto: amarelo

O teste é considerado positivo se ocorrer mudança de coloração do meio verde para o amarelo somente em tubo exposto ao oxigênio atmosférico.

**3. SIM (Sulfeto/ Indol/ Mobilidade Ágar)**

**Finalidade:** O meio SIM é um meio semi-sólido usado para determinação da produção de indol e ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) e teste de motilidade. O teste do indol detecta a ação da enzima triptofanase ajudando na diferenciação de *Enterobacteriaceae* e outros grupos de micro-organismos. O teste do indol determina a capacidade que o organismo tem em produzir indol através da degradação do aminoácido L-triptofano em indol, ácido pirúvico e amônia.

**Preparo**

Extrato de carne.....	3g
Bacto peptona.....	10g
Tripticase .....	10g
Sulfato ferroso amoniacal.....	0,2g
Tiosulfato de sódio.....	0,2g
Cloreto de sódio.....	5g
Ágar.....	4g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

- Suspender os componentes em água destilada.
- Dissolver por aquecimento à ebulição.
- Distribuir em tubos 13x100mm, em volumes de 4 a 5 mL.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Esfriar e estocar em refrigerador (4-10°C); pH final = 7,2 ± 0,2.

**Inoculação e Incubação:**

- Inocular com cultura pura de 18-24 horas de incubação.
- Semear por picada central atingindo até uma profundidade de 1 cm no meio SIM.
- Retirar a agulha seguindo a linha de entrada.
- Incubar a 35-37°C por 24 horas.
- Para pesquisa do indol, adicionar umas gotas de reagente de Kovac's.

**Interpretação:**

Pesquisa do Indol:

- **Resultado positivo** - Aparecimento de um anel vermelho.
- **Resultado negativo** - Sem formação de um anel vermelho.

Pesquisa de ácido sulfídrico - H<sub>2</sub>S:

- **Resultado positivo** - Aparecimento de um precipitado negro.
- **Resultado negativo** - Não aparecimento de um precipitado negro.

Mobilidade:

- **Móvel** - Crescimento para fora da picada.
- **Imóvel** - Quando cresce somente no local da picada.

**4. Hidrólise da Gelatina****Meio de gelatina nutriente**

Extrato de carne.....	3g
Peptona.....	5g
Gelatina.....	120g
Água destilada q.s.p .....	1000 mL

- Aquecer a água (50°C), colocar a gelatina e deixar descansar por 15 a 30 minutos.
- Adicionar o extrato de carne e a peptona.
- Aquecer novamente para dissolver todos os componentes.
- Ajustar o pH a 6,8-7,1.
- Distribuir em porções de 4 a 5 mL por tubo com tampa de rosca (frouxas).
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.
- Resfriar na posição horizontal, apertar as tampas e estocar em refrigerador (4-10°C).
- pH final =  $6,8 \pm 0,2$ .

#### **Inoculação e Incubação:**

- Inocular com cultura pura de 18-24 horas de incubação.
- Semear por picada, com uma agulha de fio níquel-cromo, até uma profundidade de 1cm.
- Um tubo controle, sem inóculo, será colocado para correr paralelo com a amostra a ser testada.
- Após o inóculo, os tubos serão incubados a 35-37°C por 7 dias.
- No final de cada período de 24 horas, os tubos serão colocados no refrigerador por 2 horas, e analisados quanto à liquefação da gelatina.

#### **Interpretação:**

**Teste positivo:** Organismo teste: meio liquefeito.

**Teste negativo:** Organismo teste: meio continua sólido e deve ser reincubado por um período adicional de até 14 dias.

### **5. Lisina /Arginina /Ornitina**

#### **Meio Básico de Moeller**

Peptona.....	5g
Extrato de carne.....	5g
Púrpura de bromocresol.....	0,1g
Vermelho de cresol .....	0,005g
Piridoxal.....	0,5g
Glicose (dextrose) .....	0,5g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

**Indicador de pH****Púrpura de bromocresol:**

Ácido - cor amarela, pH = 5,2

Alcalino - cor púrpura, pH = 6,8

- Suspender os componentes em água destilada.
- Dissolver por aquecimento à ebulição.
- Distribuir o meio pronto em quatro porções iguais.
- Adicionar a três delas os aminoácidos (L - lisina, L - arginina e L - ornitina), na concentração final de 1%, deixando um como controle.
- Homogeneizar as soluções e distribuir em porções de 3 mL em tubos 13x100 mm.
- Autoclavar a 121°C por 10 minutos.
- Estocar em refrigerador (4-10°C); pH final = 6,0.

**Inoculação e Incubação:**

- Inocular com cultura pura de 18-24 horas de incubação.
- Realizar inóculo leve, com alça de fio níquel-cromo.
- O tubo controle (sem aminoácido) será inoculado em cada bateria de aminoácido sob investigação.
- Todos os tubos, inclusive o controle, serão cobertos com 0,5 mL de óleo mineral estéril.
- Os tubos serão incubados por 48 horas a 37°C, e examinados diariamente.

**Interpretação:**

Fermentadores da Glicose

**Teste positivo:** cor púrpura

**Teste negativo:** cor amarela

**Tubo controle:** cor amarela (glicose fermentada)

Não Fermentadores da Glicose

**Teste positivo:** cor púrpura escuro

**Teste negativo:** cor púrpura clara a cinza azulado

**Tubo controle:** cor púrpura clara a cinza azulado

## 6. Oxidase

**Finalidade:** verificar se a bactéria é produtora da enzima citocromo oxidase.

Os citocromos são proteínas que contêm ferro e agem como o elo final da cadeia respiratória transferindo elétrons (hidrogênio) para o oxigênio, com formação de água. O teste da oxidase utiliza reagente, como o dicloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina, que substitui o oxigênio como aceptor de elétrons. No estado reduzido o indicador é incolor; entretanto na presença de citocromo oxidase e oxigênio atmosférico, forma-se um produto colorido rosa.

As bactérias aeróbias estritas são oxidase positiva e as bactérias aeróbias anaeróbias facultativas são oxidase negativa.

### Preparo

#### Reativo de Kovacs

Dicloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina..... 1g  
 Água destilada q.s.p.....100 mL

- Dissolver 1g do reagente em menos de 100 mL de água destilada.
- Aquecer para solubilizar.
- Transferir para um balão volumétrico e avolumar com água destilada até 100 mL.
- Deixar descansar por 15 minutos antes de usar.
- Estocar em frasco escuro para evitar exposição à luz.

#### Procedimento:

- Colocar um pedaço de papel de filtro Whatman em uma placa de Petri.
- Transferir a colônia suspeita, com o auxílio de uma haste de madeira ou plástica, para um papel de filtro.
- Adicionar 2 a 3 gotas do reagente de Kovacs no centro do papel.
- Observar a reação.

#### Interpretação:

**Teste positivo:** cor rosa/ púrpura em 10 segundos

**Teste negativo:** ausência de troca de cor

## 7. Teste da catalase

**Finalidade:** O teste da catalase é utilizado para detectar a presença da enzima catalase pela decomposição de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, que ocorre na maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas que contêm citocromo.

### Procedimento:

- Selecionar uma colônia suspeita e transferi-la para uma lâmina de vidro.
- Adicionar 1 ou 2 gotas de peróxido de hidrogênio 3%.
- Observar a reação.

### Interpretação:

**Teste positivo:** formação de bolhas.

**Teste negativo:** ausência de bolhas.

## 8. Crescimento a 42°C

### Caldo Nutriente

Cloreto de sódio.....	5g
Peptona.....	10g
Extrato de carne .....	3g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

- Pesar cada um dos reagentes separadamente.
- Verter os reagentes no erlenmeyer, solubilizando-os com água sob a placa de agitação e aquecimento, até o volume final de 1000 mL.
- Ajustar o pH para 7,4 com NaOH ou HCl.
- Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
- O meio líquido será distribuído no volume de 5 mL em tubos de ensaio 18x160mm.

### Inoculação e cultivo

- Inocular a amostra bacteriana no caldo nutriente e incubar em banho-maria a 42°C por 24 horas.

## ANEXO C - MÉTODO DE PRESERVAÇÃO

### **Liofilização (Freeze-drying)**

As culturas foram semeadas em meios de cultivo apropriados e após a incubação o crescimento foi coberto com "Skim Milk" (DIFCO 0001) a 10%, retirado com o auxílio de uma alça de "Drigalsky" e transferido para ampolas estranguladas, em volumes de 0,3 a 0,5 mL por ampola. Após a distribuição da suspensão em ampolas, estas foram colocadas em um banho de gelo seco e etanol absoluto, para congelamento rápido, aonde a temperatura do banho chega à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Em 30 - 60 segundos de imersão no banho gelado, a suspensão congelou e foi transferida para um freezer à  $-70^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceu por 24-48 horas, antes de ser liofilizada. Este congelamento rápido é importante para evitar a formação de cristais de gelo entre as membranas dos micro-organismos, o que poderia inviabilizar as células, levando a ruptura de estruturas vitais das células.

Após 72 horas à  $-70^{\circ}\text{C}$ , as ampolas foram colocadas no liofilizador com o objetivo de retirar toda água da amostra por meio do congelamento à vácuo. O processo acontece por conta da pressão que o vácuo ocasiona no material fazendo com que haja a passagem da água em estado sólido para o estado gasoso. Após 18 horas, as ampolas foram transferidas para uma "árvore", que permite a finalização do processo e o fechamento das ampolas com auxílio de um maçarico de chama dupla. Foram liofilizadas 5 ampolas de cada micro-organismo.

## ANEXO D - PREPARO DE GÉIS, SOLUÇÕES E TAMPÕES

### Gel de agarose (SAMBROOK, 1989)

Agarose (Sigma A-0169).....	1,5g
TBE (0,5X).....	100 mL
Brometo de etídio (10 mg/mL).....	3,0 µL

### Solução GET (glicose, EDTA, Tris)

Glicose anidra 20% .....	25 mL
EDTA 0,5M pH 8,0 (autoclavado).....	25 mL
Tris-HCl 1M pH 7,4 (autoclavada) .....	25 mL
Água MilliQ q.s.p.....	250 mL

A solução de glicose anidra 20% deve ser preparada na hora.

### Solução de acetato de potássio 3M

KOAc 5M.....	60 mL
Ácido acético glacial.....	11,5 mL
Água MilliQ q.s.p.....	100 mL

### Solução de hidróxido de sódio com SDS

NaOH 4 M.....	500 µL
SDS 10% .....	1 mL
Água MilliQ q.s.p.....	10 mL

Observação: Misturar NaOH 4M com água, para depois adicionar o SDS 10%.



**Tampão Tris-Borato – EDTA 10X (TBE 10X)**

TRIS base.....	121,1g
Acido bórico .....	61,8g
NA <sub>2</sub> EDTA.....	3,7g
Água MilliQ esterilizada q.s.p.....	1000 mL

**Tampão TBE 0.5X**

Tampão TBE 10X.....	50 mL
Água MilliQ esterilizada q.s.p.....	500 mL