



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Isolamento de *Enterococcus* spp. de sedimento do Lago Igapó na cidade de Londrina-PR

Larissa Botura da Silva¹, Márcia Regina Terra¹, Márcia Cristina Furlaneto² e Luciana Furlaneto Maia¹

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – CÂMPUS LONDRINA

² Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Paraná, Brasil

Avenida dos Pioneiros, 3131 CEP 86036-370 - Londrina - PR – Brasil – Telefone Geral +55 (43) 3315-6100

E-mail: (larissabotura@gmail.com)

RESUMO

O grupo Enterococcus spp. é considerado como um dos principais indicadores bacterianos de contaminação fecal de águas superficiais, principalmente as utilizadas para recreação. Estudos indicam que doenças gastrointestinais (que podem ser associadas ao banho ou a ingestão de alimentos contaminados) tem uma relação direta com a qualidade dessas águas e que os Enterococcus spp. apresentam grande eficiência como indicadores de qualidade de água. O presente estudo teve como objetivo analisar a resistência de Enterococcus spp. isolados do sedimento dos lagos Igapó I, II e III, localizados na cidade de Londrina-PR. As técnicas de coloração de Gram, catalase, placa gradiente (para analisar a resistência a metais pesados) e antibiograma caracterizaram o perfil fenotípico dos isolados; já o perfil genotípico se deu por meio da técnica de PCR identificando o gênero dos mesmos. Como resultado obtivemos que de 30 isolados, 29 são pertencentes ao gênero Enterococcus. Com relação aos metais pesados, todos os isolados apresentaram resistência; já aos antimicrobianos, o maior número de isolados resistentes foi observado frente à Vancomicina e a Eritromicina e o maior nível de sensibilidade, frente à Ciprofloxacina. Assim conclui-se que em todos os pontos coletados há a presença de Enterococcus spp. e que os mesmos apresentam índices de resistência.

Palavras-chave: *Enterococcus*, resistência, metal pesado, antimicrobianos e sedimento.

INTRODUÇÃO

Os lagos Igapó I, II e III cruzam a região central da cidade e fazem parte da micro bacia do Ribeirão Cambé, que abastece os lagos. Eles são utilizados pela população para pesca, recreação e esportes aquáticos (MELQUIADES et al., 2008).

Neste contexto, há a necessidade de se analisar a qualidade microbiológica do lago Igapó, a fim de se observar se estas atividades podem ser realizadas de modo a não oferecerem risco à saúde dos usuários. A contaminação pode advir principalmente da descarga de resíduos de atividades humanas e naturais, resultando em uma interferência indesejável (MELQUIADES, APPOLONI, 2004). *Enterococcus spp.* são cocos Gram-positivos ubíquos podendo ser isolados a partir de fontes ambientais, inclusive da água (FISHER and PHILLIPS, 2009). *Enterococcus spp.* apresentam grande eficiência como indicadores de qualidade de água (DUFOR, 1994).



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

O gênero *Enterococcus* tem ganho notoriedade como agente etiológico de infecções nosocomiais, tais como infecções do trato urinário e endocardite, o que é relacionado à multirresistência a antimicrobianos (ARIAS et al, 2012). No entanto, o SCENHIR (2009) salienta que não somente os antimicrobianos selecionam microrganismos resistentes, mas também os metais pesados como cobre.

Segundo Chapman (2003) a co-resistência é a presença de genes de resistência a antimicrobianos e a metais no mesmo elemento genético móvel. É preocupante o potencial de contaminação dos metais, pois eles podem propiciar a manutenção de genes de resistência a antibióticos tanto em ambientes naturais quanto clínicos (BAKER-AUSTIN et al., 2006).

Assim, o objetivo principal desse estudo consiste em analisar o perfil genotípico e fenotípico dos isolados provenientes dos sedimentos do lago Igapó em Londrina-Pr, frente a antimicrobianos e a metais pesados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados sedimentos de cinco pontos dos lagos Igapó I, II e III. Os pontos escolhidos foram os que apresentavam maior atividade antrópica, como pesca, banho e práticas esportivas.

As amostras de sedimento foram coletadas próximas à margem do lago, (profundidade de aproximadamente 70 centímetros) em embalagens plásticas estéreis, acondicionadas em caixa térmica até o momento do experimento.

Foram adicionados 225 mL de salina estéril a 25 gramas do sedimento (diluição de 1:10) para que se realizasse a filtração por meio da técnica de membrana filtrante. As membranas foram transferidas para o meio Kanamycin esculin azide ágar (KEA) e incubadas a 37°C. Após 24 horas, duas colônias características de cada placa foram isoladas para que fossem cultivadas em meio Brain Heart Infusion caldo (BHI caldo). Os isolados foram estocados em eppendorf contendo BHI caldo com 20% de glicerol em freezer a -80°C.

Por meio dos testes de catalase e coloração de Gram foi possível realizar a identificação fenotípica presuntiva dos isolados. A identificação genotípica seguiu protocolo descrito por FURLANETO-MAIA et al. (2011).

O teste de suscetibilidade a metais pesados foi realizado com base na metodologia de placa gradiente (SZYBALSKI, et al., 1965 com adaptações); foram utilizadas as concentrações máximas permitidas no ambiente, sendo: 3,24 mg/L para Zinco (Zn); 0,009 mg/L para Cobre (Cu); 0,01 mg/L para Chumbo (Pb); e 10 mg/L para Potássio (K), conforme estabelecido pela Resolução CONAMA 357 (2005) para águas de Classe 1 e 2.

Para se estabelecer a suscetibilidade dos isolados frente a antimicrobianos foi utilizada a técnica de disco-difusão em ágar (CLSI, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes fenotípicos observou-se a presença de cocos Gram-positivos dispostos isoladamente, aos pares ou em curtas cadeias e catalase negativos, sendo característico de *Enterococcus spp.* Com o perfil genotípico foi possível confirmar que 29 dos 30 isolados pertenciam ao gênero *Enterococcus*.

Quanto a tolerância a metais, os isolados foram testados frente a 4 tipos de metais (Cu, K, Pb e Zn) onde 100% dos isolados foram tolerantes a todos os metais (Figura 2). Segundo BAKER-AUSTIN et al. (2006), a contaminação por metal em ambientes naturais tem papel importante no que diz respeito a manutenção e proliferação de resistência a antibióticos. E que, diferente dos antibióticos, metais não são sujeitos a degradação e por esse motivo podem representar uma pressão de seleção a longo prazo.

Já com relação aos antimicrobianos, os isolados foram submetidos ao teste de disco-difusão frente a 8 tipos, sendo que 90% (n=27) foram resistentes aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina, já para ciprofloxacina 100% (n=30) dos isolados foram sensíveis (Figura 1).

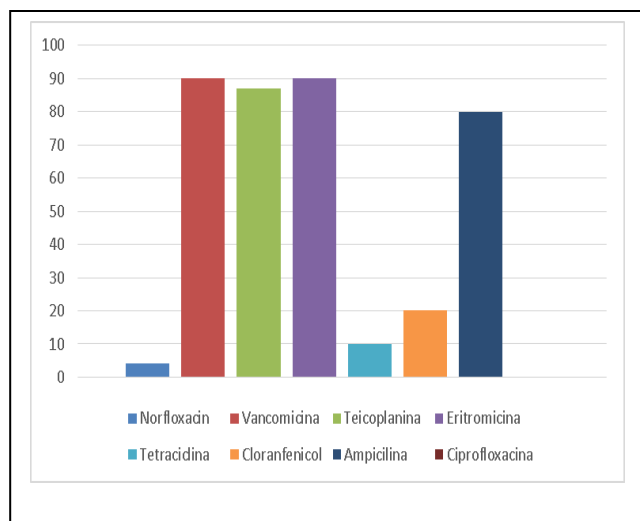


Figura1: Porcentagem de isolados resistentes a antimicrobianos quando submetidos a técnica de disco-difusão.



Figura 2: Crescimento de isolados em meio BHI ágar com metal.

O achado de isolados resistentes a glicopeptídeos é preocupante, haja visto que são uma das últimas opções terapêuticas do tratamento de isolados multirresistentes, dificultando assim o tratamento de infecções enterocócicas (ARIAS et al., 2012).

Estudos como o de Amachawadi et al.,(2013) demonstra que a presença de metais no ambiente pode exercer uma pressão seletiva favorecendo a presença de bactérias resistentes a metais e promover a co-seleção de bactérias resistentes a antimicrobianos. O SCENIHR (2009) salienta que uma das principais causas da emergência de enterococos é a multirresistencia a antimicrobianos, sendo o uso indiscriminado de antimicrobianos um fator preponderante para o aumento de resistencia bacteriana, no entanto o uso de biocidas como o cobre pode propiciar a seleção e manutenção de bactérias multirresistentes a antimicrobianos por meio de mecanismos de co-resistência.



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que nos sedimentos dos lagos Igapó I, II e III há presença do gênero *Enterococcus spp.* e que os mesmos apresentaram multiresistência a metais pesados e antimicrobianos, oferecendo assim risco de contaminação aos usuários do lago.

Agências de Fomento: Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

Amachawadi R.G, Scott H.M, Alvarado C.A et al. **Occurrence of the transferable copper resistance gene *tcrB* among fecal enterococci of U.S. feedlot cattle fed copper-supplemented diets.** Appl Environ Microbiol; 79: 4369–75,2013.

Arias C. A., Murray B. E. **The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance.** p 1-9, 2012.

Baker-Austin C, Wright M. S, Stepanauskas R, McArthur J. V. **Co-selection of antibiotic and metal resistance.**

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. *Resolução nº 375, 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.* Brasília, 2005.

Chapman J.S. **Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance.** Int Biodeter Biodegrad 2003; 51:271-6.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;** Twenty-First Informational Supplement Approved standard M100-S21, v. 31, 2011.

DUFOUR, A.P. **Bacterial indicators of recreational water quality.** Can. J. Public Health, Ottawa, v. 75, n. 1, p. 49-56, 1994.

FISHER K, PHILLIPS C. **The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus.** p 1-3, 2009.

FURLANETO-MAIA L, ROCHA K.R, HENRIQUE F.C, GIAZZI A, FURLANETO M.C. **Antimicrobial resistance in *Enterococcus spp.* isolated from soft cheese in southern Brazil.** Adv. Microbiol. n.4, p. 175-181, 2014.

MELQUIADES, F. L, APPOLONI, C. R. **Application of XRF and field portable XRF for environmental analysis.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*,Lousanne, v. 262, n. 2, p. 533–541, 2004.

MELQUIADES, F. L, GONÇALVES G.W. P. S, SILVA W.D et al. **Monitoramento de metais nos lagos igapó em Londrina, PR, usando a metodologia de EDXRF.** Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 29, n. 2, p. 129-138, 2008

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2009). **Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides** , directorate-General for Health and Consumers, European Commission.

SZYBALSKI W, BRYSON V. **GENETIC STUDIES ON MICROBIAL CROSS RESISTANCE TO TOXIC AGENTS.**