

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

Comparação de técnicas de identificação bioquímica e perfil de susceptibilidade a antibióticos de bactérias lipolíticas isoladas de efluentes residenciais, comerciais e industriais.

Andrés Felipe Gil Rave

Pelotas, 2015

Andrés Felipe Gil Rave

Comparação de técnicas de identificação bioquímica e perfil de susceptibilidade a antibióticos de bactérias lipolíticas isoladas de efluentes residenciais, comerciais e industriais.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Anelise Vicentini Kuss

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R252c Rave, Andrés Felipe Gil

Comparação de técnicas de identificação bioquímica e perfil de susceptibilidade a antibióticos de bactérias lipolíticas isoladas de efluentes residenciais, comerciais e industriais. / Andrés Felipe Gil Rave ; Patrícia da Silva Nascente, orientadora ; Anelise Vicentini Kuss, coorientadora. — Pelotas, 2015.

72 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Biorremediação. 2. Vitek®. 3. Efluentes. 4. Microrganismos. 5. Bioquímica. I. Nascente, Patrícia da Silva, orient. II. Kuss, Anelise Vicentini, coorient. III. Título.

CDD : 574.19

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca Examinadora:

Vanessa Sacramento Cerqueira

Profª. Dra Vanessa Sacramento Cerqueira

Robson Andreazza

Prof. Dr Robson Andreazza

Patrícia da Silva Nascente

Profª. Drª. Patrícia da Silva Nascente
(orientadora)

Agradecimentos

A DEUS, por mais uma oportunidade e conquista e por ter me dado força em todos os dias da minha vida para nunca desistir.

Aos meus queridos pais, Eugenio e Adiela, modelos de formação e de caráter, agradeço pelo amor e apoio incondicional, pelo exemplo de dedicação à família e por compartilharem comigo os momentos mais felizes e difíceis ao longo destes dois anos longe deles.

Aos meus irmãos, Esteban, Natalia e Mauricio e o meu cachorro, Tanainas, sem vocês não teria sido possível!

À minha namorada Maria, pela confiança, pela amizade, pelo companheirismo, pela motivação, por estar ao meu lado, sempre me auxiliando em cada momento difícil, com amor, dedicação, compreensão e muito carinho.

À minha orientada, Professora Dra. Patricia da Silva Nascente, por seu apoio e sua dedicação, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À minha co-orientadora Anelise Vicentini Kuss, pelos ensinamentos, confiança e colaboração.

Agradeço à Dra. Sílvia Ladeira, por ter me abertos as portas do seu laboratório, pelos ensinamentos, apoio e confiança, além das risadas e amizade.

À Caro por ter me ajudado com a identificação bioquímica através do sistema automatizado VITEK®2.

Às não somente colegas, mas boas amigas de laboratório à Greice, à Yohana e à Angelita, pela amizade, risadas e companheirismo ao longo destes dois anos.

Aos colegas da turma e docentes pela recepção, atenção e companheirismo que tiveram comigo desde o início do mestrado.

À banca examinadora pela contribuição para o enriquecimento do trabalho.

À UFPel e o Programa de Pós-Graduação de Bioquímica e Bioprospecção, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou essa pesquisa.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo, muito obrigado!

Resumo

RAVE, Andrés Felipe Gil. **Comparação de técnicas de identificação bioquímica e perfil de susceptibilidade a antibióticos de bactérias lipolíticas isoladas de efluentes residenciais, comerciais e industriais.** 2015. 72f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Ao longo dos anos tem sido feitos estudos comparando diferentes metodologias para a identificação de bactérias do ambiente, além de determinar os perfis de susceptibilidade de bactérias presentes em ambientes perturbados, tentando escolher técnicas apropriadas para a identificação de bactérias ambientais e determinando a presença de bactérias multirresistentes. Nesse sentido o objetivo deste trabalho foi comparar duas metodologias de identificação bioquímica bacteriana e determinar os perfis de susceptibilidade de bactérias isoladas de efluentes residenciais, comerciais e industriais. Foram utilizadas 24 bactérias do banco de bactérias do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Instituto de Biologia (IB), UFPEL, as quais foram identificadas através de provas bioquímicas convencionais e mediante o sistema automatizado VITEK®2, além de determinar o perfil de susceptibilidade a antibióticos também através do mesmo sistema automatizado. Foram identificadas seis espécies de bactérias (*Raoutella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Raoutella* sp., e *Klebsiella oxytoca*) através das provas bioquímicas convencionais e três espécies de bactérias mediante o sistema automatizado VITEK®2 (*K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *K. oxytoca*) e, além disso, os resultados da determinação do perfil de susceptibilidade a antibióticos mostraram que todos os isolados (100%) apresentaram resistência pelo menos a um antibiótico dos 18 testados pelo sistema automatizado VITEK®2. Pode se observar diferença nos resultados das duas metodologias de identificação. O sistema automatizado VITEK®2 mostrou concordância em 19 isolados (79,17%) e diferença em cinco isolados (20,83%) em relação aos resultados obtidos nas provas bioquímicas convencionais. Neste estudo não foi possível observar bactérias multirresistentes o que é uma boa característica de microrganismos que poderiam ser utilizadas em sistemas de tratamento de efluentes ou em processos de biorremediação. Obteve-se 79,7% de concordância entre as duas metodologias de identificação bioquímica analisadas. Os resultados obtidos neste trabalho indicam o sistema automatizado VITEK®2 como uma boa metodologia de determinação do perfil de susceptibilidade e identificação de bactérias de origem ambiental.

Palavras-chave: Biorremediação, VITEK®2, efluentes, microrganismos, bioquímica

Abstract

RAVE, Andrés Felipe Gil. **Comparison of biochemical identification techniques and antibiotic susceptibility profile of lipolytic bacteria from residential and industrial effluent.** 2015. 72p. Dissertation (Master Degree em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Through the years different methods have been developed for the identification of environmental micro-organisms trying to optimize bioremediation techniques, as well as determining the susceptibility profiles of bacteria present in polluted environments, attempting to reduce the impact of contaminants in ecosystems, in doing so the aim of this study was to compare two methods of bacterial biochemical identification and determine the susceptibility profiles of bacteria from residential and industrial effluent. We used 24 bacteria of bank bacterial of the Environmental Microbiology Laboratory, Institute of Biology (IB), UFPEL, which were identified by conventional biochemical tests and by the automated system VITEK®2, as well as determining the susceptibility profile to antibiotics also by the same automated system. Six species of bacteria have been identified (*Raoutella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Raoutella* sp., *Klebsiella oxytoca*) by conventional biochemical tests and three species of bacteria by the automated system VITEK®2 (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *K. oxytoca*) and furthermore, the results of determination of antibiotic susceptibility profile showed that all the isolated (100%) had at least one antibiotic resistance to 18 antibiotics tested by the automated system VITEK®2. It can be observed difference in the results of both methods of identification. The automated system VITEK®2 had a concordance in 19 isolates (79.17%) and difference in five isolates (20.83%) compared to the results obtained in conventional biochemical tests. In this study it was not possible to observe multiresistant bacteria, which is a good feature of micro-organisms that could be used in wastewater treatment or in bioremediation process systems. We got up 79.7% agreement between the two biochemical identification methods analyzed. The results obtained in this study indicate the automated system VITEK®2 as a good method for determining the susceptibility profile and identification of bacteria of environmental origin.

Key-words: Biorremediation, VITEK®2, *S. marcescens*, micro-organisms, biochemistry

Lista de figuras

Figura 1- Sistema automatizado VITEK®2 (bioMérieux).....	22
Figura 2- Cartão de identificação colorimétrica específico para bactérias Gram Negativas (GN) fermentadoras ou não fermentadoras utilizado no VITEK 2.....	23
Figura 3- Substratos presentes no cartão de identificação colorimétrico específico para bactérias Gram Negativas fermentadoras ou não fermentadoras (GN) utilizado no sistema VITEK®2.....	24
Figura 4- Cartão para antibiograma específico para bactérias Gram Negativas (GN) fermentadoras ou não fermentadoras utilizado no VITEK®2.....	27

Lista de Abreviaturas

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio.

UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket - Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo.

H₂S: Produção de Sulfeto de Hidrogênio

VP: Voges-Proskauer.

NaCl: Hidróxido de sódio

MSA: Sistema AutoMicrobic.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.2 TÉCNICAS CONVENCIONAIS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA....	12
2.2.1 Principais testes bioquímicos para identificação de bactérias.....	14
2.2.1.1 Testes bioquímicos comuns para bactérias Gram + e Gram -.....	15
2.2.1.1.1 Fermentação de Carboidratos.....	15
2.2.1.1.2 Produção de Indol.....	15
2.2.1.1.3 Motilidade.....	15
2.2.1.1.4 Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S).....	16
2.2.1.1.5 Voges-Proskauer (VP).....	16
2.2.1.1.6 DNase.....	16
2.2.1.2 Principais testes bioquímicos específicos para bactérias Gram +....	17
2.2.1.2.1 Catalase.....	17
2.2.1.2.2 Prova da esculina.....	17
2.2.1.2.3 Teste de CAMP.....	17
2.2.1.2.4 Coagulase.....	18
2.2.1.2.5 Assimilação de nitrato.....	18
2.2.1.3 Principais testes bioquímicos específicos para bactérias Gram -....	18
2.2.1.3.1 Citocromo Oxidase.....	18
2.2.1.3.2 Agar MacConkey.....	19
2.2.1.3.3 Produção de Urease.....	19
2.2.1.3.4 Vermelho de Metila.....	19
2.2.1.3.5 Citrato.....	20
2.3 TÉCNICAS AUTOMATIZADAS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA....	20
2.3.1 VITEK (bioMérieux).....	21
2.4 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS.....	25
2.5 BIORREMEDIAÇÃO.....	27
2.5.1 Microrganismos produtores de lipases.....	30

3	Objetivos.....	33
3.1	Objetivo Geral.....	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	Artigo.....	34
5	Conclusão.....	58
6	Perspectivas.....	59
7	Referencias.....	60

1 INTRODUÇÃO

Diversas atividades desenvolvidas pela humanidade se caracterizam como fontes potenciais de contaminações ambientais. Pode-se citar, como sendo os principais geradores de resíduos potencialmente poluentes para o meio ambiente, o lixo, o esgoto, a agricultura e as atividades industriais em geral (VEIGA, 2003). Além disso, observa-se um aumento de efluentes ricos em óleos e gorduras, originados de residências, restaurantes e indústrias alimentícias, devido à alta demanda da alimentação humana.

O uso de microrganismos no tratamento biológico de águas contaminadas vem promovendo importantes mudanças nos processos tecnológicos de tratamentos como sorção, acumulação e remediação, pois se mostram excelentes nestas ações, possibilitando a retirada de substâncias consideradas tóxicas encontradas nos rejeitos de atividades industriais e domésticas (KÜMMERER; HENNINGER, 2003). Entretanto os microrganismos presentes nestes ambientes vêm apresentando resistência a vários antibióticos utilizados nessas atividades.

Antes do século XX, os esforços se concentravam na tentativa de encontrar substâncias químicas específicas que permitissem diferenciar as espécies de microrganismos presentes (HARDY et al., 1952). A identificação das espécies de microrganismos se baseia em métodos fenotípicos, blocos de reações bioquímicas, resistência aos antibióticos e padrões de ácidos graxos (O'HARA, 2005). No entanto, devido à sua atividade bioquímica limitada e morfologia variável, os microrganismos são frequentemente identificados erroneamente por métodos convencionais (KISKA et al., 1996).

Sob essa preocupação, tem-se procurado métodos para aumentar a precisão e reduzir tempos de resposta na identificação bacteriana. Entre as técnicas usadas em microbiologia, uma das mais utilizadas é a identificação mediante provas bioquímicas convencionais, com desvantagem que, em alguns casos, dependendo do micro-organismo, pode ser lenta e imprecisa (MELLMANN et al., 2008). No entanto, mesmo que os testes bioquímicos tenham sido desenvolvidos para diferenciar gêneros e espécies de bactérias, foram feitos outros esforços para diminuir a quantidade de tempo necessária não só para obter um resultado de teste positivo, mas também para gerar uma identificação correta (O'HARA, 2005).

Os sistemas automatizados realizam a identificação de bactérias em tempos mais curtos, no entanto, o custo de manutenção é alto (KUMAR et al., 2009). Os sistemas comerciais de identificação foram desenvolvidos a partir da combinação de provas convencionais e enzimáticas com substratos cromogênicos, e como exemplo se tem API®, Enterotube®, Minitek®, VITEK®, BIOLOG® entre outros. Nesses sistemas, diferentes substratos miniaturizados são utilizados e proporcionam resultados rápidos e permitem a identificação dos principais grupos bacterianos. Os perfis metabólicos obtidos são comparados com perfis estabelecidos no banco de dados do equipamento (BUSCH; NITSCHKO, 1999).

O aumento da resistência devido ao uso generalizado e inadequado de antibióticos é uma preocupação crescente em muitas populações. Alguns antibióticos foram utilizados indiscriminadamente ao longo de tempo e têm causado uma redução na sensibilidade dos microrganismos frente a estes antibióticos, conduzindo ao desenvolvimento de uma nova geração de fármacos, o que por sua vez também estão propiciando o aumento da resistência bacteriana (PATERSON, 2006).

A resistência de bactérias a antibióticos e outros fármacos antimicrobianos é um fenômeno natural e de pressão seletiva. Devido ao uso indiscriminado e recorrente dos antimicrobianos, tornou-se um problema de saúde pública, pois elas são eliminadas e despejadas no ambiente sem qualquer prevenção e muitos desses medicamentos são liberados do organismo praticamente intactos (BATISTA et al., 2007).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi determinar o perfil de susceptibilidade e comparar duas metodologias de identificação bioquímica em bactérias lipolíticas isoladas de efluentes residenciais, comerciais e industriais da região de Pelotas/RS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

TÉCNICAS CONVENCIONAIS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.

As análises ou ensaios bioquímicos para a identificação bacteriana são testes simples desenvolvidos para demonstrar claramente uma característica bioquímica específica, como a presença ou ausência de uma atividade enzimática particular, um grupo específico de enzimas em alguma via metabólica, crescimento a uma dada temperatura ou na presença de inibidores, entre outros. Esses ensaios não significam, de forma alguma, um profundo estudo do metabolismo bacteriano (SAUER; KLIEM, 2010).

Existem alguns procedimentos que são realizados antes de identificar taxonomicamente as bactérias através das provas bioquímicas, que são as fases de isolamento e purificação de colônias bacterianas e observação da morfologia e agrupamento celular através de diferentes colorações. Para as bactérias o método rotineiramente realizado para visualização micromorfológica é a coloração de Gram. A coloração celular das bactérias revela como estas se agrupam em estruturas de diferentes tamanhos e formas. A coloração de Gram é o primeiro passo para a identificação de bactérias, pois as caracteriza como bactérias Gram+ e Gram- (BOU et al., 2011).

No entanto, a identificação bioquímica convencional implica uma carga de trabalho, consumo de material e tempo alto, uma vez que a identificação de bactérias pode levar de horas e até dias (HARBARTH et al., 2003).

Um dos primeiros experimentos para identificar bactérias utilizando provas bioquímicas foi criado por Arnold e Weaver, (1948), que descreveram uma microtécnica para detectar a produção de indol em bactérias em menos de 6 minutos (até 2h) utilizando um inóculo de 1mL em meio de cultura. Nos anos seguintes, foram descobertas as moléculas mediadoras da formação do indol. O triptofano é um aminoácido constituinte de muitas peptonas, e particularmente da tripticase, que pode ser oxidada por bactérias para formar indol. No processo metabólico age um grupo de enzimas chamadas triptofanase. O indol produzido é combinado com o reagente aldeído Kovac's ou Erlich, para originar um composto vermelho (ARNOLD; WEAVER, 1948).

Os ensaios bioquímicos usados tradicionalmente, conhecidos como testes bioquímicos convencionais, geralmente determinam a atividade de uma via metabólica (conjunto de reações químicas) a partir de um substrato,

incorporado em um meio de cultura, que vai ser degradado ou não pelo micro-organismo presente nesse meio (FREYDIERE; GUINET, 1997). Existem diferentes sistemas que facilitam a realização de tais ensaios e dão o melhor conjunto de testes bioquímicos para a identificação de um grupo de bactérias (AQUILANTI et al., 2004).

Para realizar as provas bioquímicas, é possível utilizar diferentes sistemas de trabalho (meio de cultura, bactérias, antibiogramas, entre outros), que podem ser variados, para o mesmo teste, se forem diferentes microrganismos. Por exemplo, para microrganismos que são exigentes quanto a condições de crescimento, se acrescenta diferentes tipos de açúcares no meio de cultura. A determinação do gênero ou espécie dos microrganismos alvo pode ser verificada em manuais de identificação ou bases de dados na internet (ABBOTT et al., 2003).

Historicamente, foi em 1949, que Soto descreveu um processo para testar fermentação de carboidratos, utilizando discos de papel contendo carboidratos e púrpura de bromocresol (SOTO, 1949). Simmons, (1926), demonstraram que o citrato, quando usado como única fonte de carbono, pode diferenciar gêneros e espécies, mas que funcionou melhor quando foram adicionados ágar e azul de bromotimol ao meio de cultura. No meio de cultura, o fosfato monoamônio é a única fonte de nitrogênio e citrato de sódio é a única fonte de carbono. Ambos os componentes são necessários para o desenvolvimento bacteriano. O magnésio é cofator enzimático. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico, e azul de bromotimol é o indicador de pH, que fica azul em meio alcalino. O meio de cultura permite diferenciar os microrganismos capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono e sais de amônio como única fonte de nitrogênio, com a consequente produção de alcalinidade (PINTO et al., 2004). A metabolização do citrato ocorre, naqueles organismos que possuem a citrato permease presente no ciclo do ácido tricarboxílico. A clivagem de citrato gera oxaloacetato e depois piruvato. Este último, na presença de um meio alcalino, dá origem a ácidos orgânicos que, quando utilizado como uma fonte de carbono, produzem carbonatos e bicarbonatos alcalinos. O meio fica azul e em seguida este é indicativo da produção da citrato permease (FRANZOLIN, 2008).

Levine et al. (1934) relataram que a detecção da produção de H₂S podia ser melhorada pela utilização de um meio que não contenha acetato de chumbo, tal como descrito por Kligler, (1918). Em 1946, Christensen criou um meio que detecta a presença da enzima urease. No meio de cultura, a glicose e a tripticase, proporcionam nutrientes para o crescimento de microrganismos. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico e o vermelho de fenol é o indicador de pH. Algumas bactérias hidrolisam a ureia pela ação da enzima urease liberando amônia e dióxido de carbono. Estes produtos modificam o meio a alcalino, mudando o vermelho de fenol, de amarelo para vermelho. Neste meio, a fermentação da enzima urease ativa a glicose, acelerando a taxa de metabolismo em organismos que hidrolisam lentamente ureia, e de algumas espécies do gênero *Klebsiella* ou *Enterobacter* (CHRISTENSEN, 1948).

Alguns dos testes bioquímicos para a determinação das características metabólicas de bactérias que precisam ser identificadas são técnicas rápidas e podem avaliar a presença de enzimas pré-formadas em faixas de leitura de alguns segundos a algumas horas. Outras análises são necessárias, como o crescimento do micro-organismo, de até 18 a 48h para avaliar componentes metabólicos ou determinar a degradabilidade de algum substrato específico acrescentado nos meios de cultura. No entanto, alguns destes testes podem ser executados de modo rápido depois de incubação de cerca de 2-6h (BOU et al., 2011).

Principais testes bioquímicos para identificação de bactérias

Depois de serem feitas as primeiras etapas, como a purificação e coloração das colônias isoladas, são feitas baterias bioquímicas que são simplesmente testes bioquímicos de identificação dos dois grupos principais de bactérias, as Gram positivas e Gram negativas (BARROW; FELTHAM, 1993).

Para as bactérias Gram positivas e Gram negativas são realizados testes em comuns para diferenciar espécies ou gêneros dentre esses dois grupos de bactérias, como o teste VP, produção de indol, produção de H₂S, motilidade, fermentação de açúcares ou carboidratos, DNase, entre outros. Para cada grupo existem também testes específicos, por exemplo, para as bactérias Gram positivas são realizados principalmente os teste de coagulase, catalase, teste de CAMP e esculina e para as bactérias Gram negativas são

realizados principalmente os teste de oxidase, crescimento em meio MacConkey, fermentação de lactose, teste de vermelho de Metila, degradação de ureia e citrato, entre outros (QUINN et al., 1994).

Testes bioquímicos comuns para bactérias Gram + e Gram -

Fermentação de Carboidratos

A fermentação é um processo metabólico de oxidação-redução que ocorre em condições de anaerobiose, onde um substrato orgânico é oceptor final de hidrogênio. A reação de fermentação de açúcares leva a formação de ácidos orgânicos como metabólitos, e esses ácidos reduzem o pH do meio. O teste consiste em detectar a acidificação do meio de cultivo através de um indicador de pH (vermelho de fenol), e a acidez é visualizada quando o meio atinge a coloração amarela. A diferenciação de microrganismos é realizada a partir dos diferentes carboidratos metabolizados, devido à distinta atividade enzimática e pelos tipos e quantidades de ácidos produzidos. Neste teste podem ser utilizados diferentes carboidratos como glicose, lactose, sacarose, entre outros (MILAN; ZAROR, 2004).

Produção de Indol

Um dos produtos resultantes da degradação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase, é o indol. As bactérias que apresentam esta enzima são capazes de hidrolizar e desaminar o triptofano, levando a formação de um complexo vermelho a partir da reação do indol com o reagente alcólico p-dimetilaminobenzaldeído, caracterizando a positividade para o teste. A produção de indol tem sido largamente utilizada como auxiliar na diferenciação entre alguns gêneros e entre espécies do mesmo gênero, como bactérias do gênero *Klebsiella* (SIDRIM, 2004).

Motilidade

Teste realizado a partir do crescimento bacteriano em meios semi-sólidos com variações nas quantidades de ágar, dependendo do grupo de bactérias. As bactérias móveis apresentam um crescimento difuso que se estende lateralmente a partir da linha de inoculação, enquanto as imóveis crescem somente no ponto de inoculação. O meio mais utilizado para determinar a motilidade bacteriana é o meio SIM, que permite visualizar no

mesmo teste a produção de sulfeto de hidrogênio, produção de indol e motilidade. O Meio SIM é um meio recomendado para diferenciação de enterobactérias (FRANZOLIN, 2008).

Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)

Diferentes meios de cultivo podem ser utilizados neste teste, no entanto a maioria utiliza peptona e tiosulfato de sódio como fonte de enxofre. O H₂S é produzido a partir da ação de uma enzima tiosulfato-redutase sobre o tiosulfato de sódio e evidenciado pela reação do H₂S com o citrato férrico amoniacal, dando origem a sulfeto de ferro, um sal insolúvel de coloração negra, caracterizando a positividade do teste. A determinação da produção de H₂S é usada para a diferenciação de bacilos entéricos patogênicos Gram negativos, como espécies do gênero *Salmonella* e bactérias gram positivas, como *Clostridium* (MINAMI, 2003).

Voges-Proskauer (VP)

Uma via de fermentação de glicose que as bactérias podem utilizar é a via de acetoína (acetil metil carbinol). O ácido pirúvico é formado pela degradação fermentativa da glicose e é metabolizado pela via do butileno glicol, em acetoína, um produto final neutro. O acetil é convertido em diacetil, pelo hidróxido de potássio a 40% e O₂. O diacetil é convertido em um complexo vermelho pela ação catalítica de α-naftol e creatina. Em geral, entre as espécies mais comuns VP positivas são as dos gêneros *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* e as espécies dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, e *Escherichia coli* apresentam reação de VP negativa (ANDRADE et al., 2010).

DNase

O teste da DNase é usado para detectar a atividade da enzima desoxirribonuclease produzida por diferentes espécies bacterianas. As bactérias produtoras desta enzima, quando cultivadas em ágar DNase adicionado do corante metacromático azul de ortotoludina a 0,005%, despolimerizam o ácido nucleico contido no meio, levando ao aparecimento de uma coloração rósea ao redor das colônias produtoras de DNase. O Teste de

DNase é utilizado para diferenciar, particularmente, *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens* (FRANZOLIN, 2008).

Principais testes bioquímicos específicos para bactérias Gram +

Catalase

O princípio do teste da catalase baseia-se na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e gás oxigênio, através da enzima intracelular dos microrganismos, a catalase. A positividade da reação é demonstrada pela produção de bolhas de gás oxigênio. A catalase é produzida por muitos microrganismos e é usualmente empregada para diferenciar *Staphylococcus*, que são catalase positivos de *Streptococcus* (catalase negativos), ou também para diferenciar bacilos Gram positivos como *Lactobacillus* e *Erysipelothrix* (catalase negativos) de *Listeria* e a maioria dos *Corynebacterium* que são catalase positivos (OZYURET et al., 2008).

Prova da esculina

Algumas espécies de enterobactérias apresentam a capacidade de hidrolizar a esculina em esculetina e glicose, através da ação da enzima β -glicosidase. A reação libera sais de ferro solúveis que promovem o escurecimento do meio de cultura. A prova é utilizada para diferenciar e identificar espécies de *Enterococcus* e *Streptococcus* (SIDRIM, 2004).

Teste de CAMP

Trata-se de uma hemólise sinérgica produzida pela ação da esfingomielinase estafilocócica (beta toxina) e a ceramida (N-acetil-esfingosina) uma proteína de ligação do *S. agalactiae*. Ela é produzida quando a toxina beta das colônias dos *Staphylococcus* sp. altera as hemácias (bovinos) sensibilizadas à ação da proteína de ligação (ceramida) do *S. agalactiae*. A ação combinada dos dois fatores resulta numa hemólise completa. O fenômeno de CAMP é agora a base do teste principal para a presença do *S. agalactiae* em amostras de secreção láctea. A toxina beta dos estafilococos pode ser incorporada ao meio para isolamento e identificação do *S. agalactiae*. Existe também um teste rápido realizado em tubo com hemácias sensibilizadas pela toxina beta (CALVINHO et al., 1998).

Coagulase

Verifica a capacidade de microrganismos reagirem com o plasma e formarem um coágulo, uma vez que a coagulase é uma proteína com atividade similar à protombrina, capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, que resulta na formação de um coágulo visível. A coagulase conjugada (prova em lâmina), é também conhecida como fator de aglutinação, encontra-se unida à parede celular bacteriana e não está presente em filtrados de cultivos. Quando as células bacterianas são suspensas em plasma (fibrinogênio), formam-se cordões de fibrina entre elas, o que causa agrupamento sob a forma de grumos visíveis, resultando em uma reação positiva (OZYURET et al., 2008).

Assimilação de nitrato

O teste de redução do nitrato detecta a capacidade de bactérias para utilizar o nitrato como um aceptor final de elétrons na sua cadeia respiratória. Nesta reação, o nitrato é reduzido para nitrito, que pode ser posteriormente reduzido para gás nitrogênio ou amônia. A redução do nitrato em nitrito é detectada pela adição do ácido sulfanílico e N,N-dimetil-alfa-naftil-amina, que se combinam com o nitrito para formar um composto vermelho, o *p*-sulfobenzeno-azo-alfa-naftilamina (que indica um teste positivo). Se, após a adição dos reagentes, não ocorrer alteração de cor (reação negativa), é adicionado pó de zinco para determinar a presença de nitrato não reduzido ou de outros produtos além de nitrito (amônia, nitrogênio, óxido nítrico, hidroxilamina). Caso o nitrato tenha sido reduzido para além de nitrito, os íons de zinco não irão produzir alteração de cor (resultado positivo). Uma reação positiva para o zinco e negativa para o nitrito indica, presumivelmente, que o nitrato foi reduzido para os produtos finais obtidos depois do nitrito (WINDERMAN et al., 1977).

Principais testes bioquímicos específicos para bactérias Gram –

Citocromo Oxidase

Os citocromos são hemoproteínas que contêm ferro e funcionam como a última molécula de ligação da cadeia respiratória aeróbica, transferindo elétrons ao oxigênio com a formação de água. O sistema de citocromo é encontrado em aeróbios e organismos anaeróbios facultativos. Este teste é

importante na identificação de organismos que não possuem a enzima ou são anaeróbios obrigatórios. Nesse teste, a enzima citocromo oxidase C é pesquisada utilizando-se corantes como o cloridrato de p-fenilenodiamina a 1%, que substitui o oxigênio comoceptor artificial de elétrons. Na forma reduzida, o corante é incolor, mas, na presença de citocromo oxidase C e oxigênio, a p-fenilenodiamina é oxidada, formando azul de indofenol. Esta prova é muito útil para diferenciar as enterobactérias (oxidase-negativas) das *Pseudomonas* spp. (oxidase-positivas). É utilizada também para ajudar na diferenciação entre os gêneros *Moraxella* e *Neisseria* (oxidase positivos) de *Acinetobacter* (oxidase negativo), e entre *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio* (oxidase-positivos) de Enterobacteriaceae (QUINN et al., 1994).

Agar MacConkey

Ágar MacConkey é um meio seletivo (pela presença de sais biliares, cristal violeta e NaCl, principais componentes inibidores de bactérias Gram positivas) para enterobactérias destinado à detecção, isolamento, contagem de coliformes e patógenos intestinais da água, laticínios e materiais biológicos. Os organismos que fermentam lactose, produzem pH localizado, o qual, seguido pela absorção do vermelho neutro contido no meio, confere uma coloração vermelha ou rósea à colônia, enquanto que colônias não fermentadoras de lactose permanecem incolores ou transparentes (SIDRIM, 2004).

Produção de Urease

Esse teste leva em consideração a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono pela enzima urease. A amônia torna o meio mais alcalino, levando ao aumento do pH, que resulta na mudança de coloração do indicador do amarelo para o róseo intenso, identificando-se a positividade da prova. A produção de urease é característica das espécies *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* (BARROW; FELTHAM, 1993).

Vermelho de Metila

Exame quantitativo utilizado na identificação de espécies bacterianas que produzem ácidos orgânicos (lático, acético e fórmico) a partir de fermentação da glicose, visto que as bactérias que seguem a via de fermentação de ácidos mistos produzem ácidos suficientes para manter o pH

abaixo de 4,4 (coloração vermelha). A detecção da formação desses ácidos é realizada pelo indicador vermelho de metila. O teste serve para diferenciar organismos entéricos, em particular *E. coli* de *E. aerogenes* (OZYURET et al., 2008).

Citrato

Citrato de sódio é um composto orgânico simples encontrado como um dos metabólitos de ciclo de Krebs. Algumas bactérias podem obter energia utilizando o citrato como única fonte de carbono. O meio a ser empregado para o teste inclui citrato de sódio e fosfato de amônia como única fonte de carbono e nitrogênio, e deve ser isento de proteínas e carboidratos. As bactérias que produzem as enzimas citratase conseguem utilizar o citrato como única fonte de carbono e utilizam o nitrogênio do sal de amônio produzindo amônia, alcalinizando o meio. O indicador utilizado é azul de bromotimol, que em pH ácido é amarelo e em pH alcalino é azul. Este teste permite a diferenciação de enterobactérias com base na utilização de citrato. Entre as enterobactérias citrato negativo são *Escherichia* e *Shigella* e entre citrato positivo são *Arizona*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella* e *Serratia* (FRANZOLIN, 2008).

TÉCNICAS AUTOMATIZADAS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Durante a última década, tem se desenvolvido aparelhos automatizados e semiautomatizados capazes de identificar bactérias e testar sua sensibilidade em um período de duas e sete horas a menos, quando comparado com os métodos tradicionais (ROBINSON et al., 1995).

Existem diferentes tipos de sistemas automatizados para a identificação de bactérias, cuja diferença reside em diversos fatores como: a velocidade e confiabilidade dos resultados de identificação e susceptibilidade antimicrobiana, a quantidade de microrganismos presentes nas bases de dados que são utilizados pelos sistemas, os custos de manutenção e o controle de qualidade dos resultados (BERKE; TIERNO, 1996).

Todos os sistemas de identificação comerciais baseiam-se nos métodos convencionais já estabelecidos. Estes incluem reações baseadas em pH, que requerem de 15 a 24 horas de incubação; reações baseadas em enzimas, que necessitam de duas a quatro horas; a utilização de fontes de carbono, de

detecção visual de crescimento bacteriano, ou detecção de ácidos graxos voláteis ou não voláteis através de cromatografia em fase gasosa (O'HARA et al., 2003).

Atualmente, entre os sistemas automatizados disponíveis mais utilizados se encontram o Phoenix® (Becton Dickinson) e o VITEK®2 (bioMérieux). Estes sistemas permitem uma identificação mais rápida de bactérias gram-positivas e gram-negativas em relação aos métodos convencionais. A avaliação é realizada com base em versões modificadas de reações bioquímicas convencionais por substratos cromogênicos ou fluorescentes (O'HARA, 2005).

VITEK (bioMérieux)

Nos primeiros dias da corrida espacial, os laboratórios McDonnell Douglas Astronautics Co. Bioscience introduziram o conceito de detectar, enumerar e identificar microrganismos em um ambiente de naves espaciais. Em 1973, nasceu o Sistema AutoMicrobic (MSA) (McDonnell Douglas Corp., St. Louis, Mo.). Ele integrava um sistema miniaturizado de plástico descartável amostra-substrato, uma lente ótica de estado sólido para detecção microbiana e um minicomputador para o controle e processamento das amostras. Hoje é reconhecido como a primeira geração dos instrumentos VITEK (ALDRIDGE et al., 1977).

O sistema VITEK (bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO, EE. UU.) (Figura 1) é um aparelho que identifica e estabelece o padrão de susceptibilidade a antibióticos de diferentes grupos de microrganismos de importância clínica. A identificação de bactérias é feita através de uma suspensão de células do micro-organismo a ser identificado, onde são colocados os cartões de identificação. Os cartões possibilitam a identificação de microrganismos importantes na área clínica e organismos a estes relacionados, através de 64 testes bioquímicos fluorescentes, que incluem a assimilação de carboidratos, ácidos orgânicos e detecção de oxidases e arilamidases. Estudos têm mostrado que a utilização deste sistema pode identificar corretamente mais de 93% das cepas testadas de origem clínico em período médio de 18 horas (MASSONET et al., 2004).



Figura 1: Sistema automatizado VITEK[®]2 (bioMérieux).

O VITEK também realiza provas de sensibilidade antimicrobiana de modo semelhante à identificação, através de cartões (Figura 2) que contêm diferentes antibióticos em concentrações padronizadas, correspondentes aos limites de susceptibilidade estabelecidos pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (DOERN et al., 1997) hoje conhecido como Clinical Laboratory Standard International (CLSI). A mais notável vantagem do sistema VITEK é a velocidade com que os resultados são obtidos (VARGAS et al., 2005).

Em 1988, o Vitek Systems Inc., foi comprado pela BioMérieux Inc., e em 1989, foi utilizado o primeiro cartão de identificação para bactérias gram-negativas (GN). Em 1996 surgiu o cartão GN+, contendo maior número de perfis de microrganismos no banco de dados, melhorando a precisão da identificação e diminuindo o tempo entre 4,1 e 5,7 horas para a obtenção dos resultados (BOURBEAU; HEITER, 1998).



FIGURA 2. Cartão de identificação colorimétrica específico para bactérias Gram Negativas (GN) fermentadoras ou não fermentadoras utilizado no VITEK 2.

Os cartões utilizados pelo sistema VITEK atualmente têm 64 poços, cada um contendo um teste individual com diferente substrato (Figura 3). Os poços medem diversas atividades metabólicas, como a acidificação, a alcalinização, a hidrólise enzimática e crescimento na presença de substâncias inibidoras. Uma película transparente presente em ambos os lados do cartão permite uma transmissão de oxigênio adequada, mantendo o recipiente selado que impede o contato com as misturas de substrato-organismo (SUN et al., 2000). Os cartões são identificados por códigos de barras, que contêm informações sobre o tipo de produto, número de lote, data de expiração, e um identificador exclusivo que pode ser ligado à amostra, antes ou depois de carregar o cartão no sistema (LIU et al., 2003).

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0.1875 mg
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0.3 mg
7	D-CELLOBIOSE	dCEL	0.3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg
10	H ₂ S PRODUCTION	H ₂ S	0.0024 mg
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0.0408 mg
12	Glutamyl Arylamidase pNA	AGLTp	0.0324 mg
13	D-GLUCOSE	dGLU	0.3 mg
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	GGT	0.0228 mg
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	OFF	0.45 mg
17	BETA-GLUCOSIDASE	BGLU	0.036 mg
18	D-MALTOSE	dMAL	0.3 mg
19	D-MANNITOL	dMAN	0.1875 mg
20	D-MANNOSE	dMNE	0.3 mg
21	BETA-XYLOSIDASE	BXYL	0.0324 mg
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	BAlap	0.0174 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
26	LIPASE	LIP	0.0192 mg
27	PALATINOSE	PLE	0.3 mg
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
31	UREASE	URE	0.15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
33	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC	0.3 mg
34	D-TAGATOSE	dTAG	0.3 mg
35	D-TREHALOSE	dTRE	0.3 mg
36	CITRATE (SODIUM)	CIT	0.054 mg
37	MALONATE	MNT	0.15 mg
39	5-KETO-D-GLUCONATE	5KG	0.3 mg
40	L-LACTATE alkalinisation	ILATk	0.15 mg
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
42	SUCCINATE alkalinisation	SUCT	0.15 mg
43	Beta-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0.0306 mg
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0.036 mg
45	PHOSPHATASE	PHOS	0.0504 mg
46	Glycine ARYLAMIDASE	GlyA	0.012 mg
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	ODC	0.3 mg
48	LYSINE DECARBOXYLASE	LDC	0.15 mg
52	DECARBOXYLASE BASE	ODEC	N/A
53	L-HISTIDINE assimilation	IHISa	0.087 mg
56	COUMARATE	CMT	0.126 mg
57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0.0378 mg
58	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	O129R	0.0105 mg
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	GGAA	0.0576 mg
61	L-MALATE assimilation	IMLTa	0.042 mg
62	ELLMAN	ELLM	0.03 mg
64	L-LACTATE assimilation	ILATa	0.186 mg

FIGURA 3. Substratos presentes no cartão de identificação colorimétrica específico para bactérias Gram Negativas fermentadoras ou não fermentadoras (GN) utilizado no sistema VITEK 2.

A resistência antimicrobiana constitui um dos principais problemas de saúde pública e ambiental, sendo uma ameaça séria que revela todos os dias novos mecanismos de resistência.

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são constantemente liberados no meio ambiente, principalmente, através de águas residuais de indústrias alimentícias ou de hospitais (PETROVIC et al., 2003). Além das consequências para a saúde humana, as preocupações da comunidade científica aumentam, devido a grande poluição das águas superficiais e águas profundas com resíduos de antimicrobianos ou de seus metabólitos e também a presença de microrganismos resistentes (HIRSH et al., 1999).

Observa-se que o maior aumento em bactérias resistentes ocorre nos países onde existe prescrição excessiva de antibióticos para uso humano ou uso indiscriminado destes compostos em medicina veterinária para diversos fins, principalmente, como promotores de crescimento animal (SANTOS, 2004).

Apesar do uso generalizado de antibióticos na medicina humana e veterinária, estes compostos recebem pouca atenção como contaminantes de ambientes aquáticos, considerando que, ao contrário de outros produtos químicos, os antibióticos têm um efeito direto sobre os microrganismos que se desenvolvem nesses ecossistemas e, além disso, os antibióticos podem persistir por muito tempo no ambiente (ALONSO; SÁNCHEZ, 2001).

Nos ambientes aquáticos, a transferência de material genético está intimamente relacionada com a atividade bacteriana (SÉVENO et al., 2002), que por sua vez depende dos seguintes fatores: disponibilidade de nutrientes, densidade bacteriana, temperatura, presença de compostos que exercem pressão seletiva de antibióticos e bactérias doadoras e receptoras de genes. Os sedimentos e rochas submersas, estações de tratamento de efluentes e estações de tratamento de água proporcionam superfícies colonizadas onde são favorecidas a atividade bacteriana e a transferência de material genético (LIPSITCH; SAMORET, 2002).

A grande maioria dos trabalhos avaliando a resistência bacteriana aos antibióticos é feita a partir de microrganismos isolados de amostras clínicas, no entanto, as pesquisas também devem ser direcionadas para analisar a

resistência de microrganismos obtidos a partir de amostras ambientais (ALONSO; SÁNCHEZ, 2001), a fim de avaliar o seu papel como um possível reservatório de genes que proporcionam resistência aos antibióticos e capacidade de transferência horizontal desse material genético entre os microrganismos, além de verificar a presença de patógenos humanos nesses ecossistemas (HARAKEH et al., 2006).

Tem sido observado um aumento significativo na abundância relativa de genes de resistência nas amostras coletadas de estações de tratamento de águas residuais industriais. Ainda assim, estes genes de resistência também são identificados em amostras recolhidas em ambientes aquáticos onde não se observa descarga de efluentes de nenhum tipo, o que sugere a existência de genes de resistência natural (PRUDEN et al., 2006). Muitos autores afirmam que as estações de tratamento contribuem para a disseminação de genes de resistência aos antibióticos no meio ambiente e têm um impacto sobre as comunidades bacterianas presentes nos rios onde o efluente é descarregado (LAPARA et al., 2011).

Os métodos comerciais comumente usados para determinar o perfil de susceptibilidade dos microrganismos pesquisados, utilizam concentrações ou diluições que se diferenciam entre as categorias de interpretação específicas. Quando são usados sistemas comerciais, se devem seguir as recomendações da fabricação referentes ao armazenamento, inoculação e incubação (NASIM et al., 2004).

Atualmente no mercado existem três sistemas automatizados que incluem além da identificação taxonômica de microrganismos, também definem o perfil de susceptibilidade a uma gama de antibióticos. Esses sistemas são: Vitek, VITEK®2 Compaq (Biomerieux), Microscan WalkAway e Autoscan (Siemens) e Phoenix BD (Becton Dickinson) (NAKASONEA et al., 2007).

A susceptibilidade antimicrobiana é realizada de forma semelhante aos testes bioquímicos, através de cartões contendo antibióticos em diferentes diluições padronizadas, correspondentes aos pontos de corte de sensibilidade estabelecidos pelo Instituto of Clinical Laboratory Standards Institute e (CLSI) (Figura 4). Através de espectrofotometria, de acordo com a variação do crescimento bacteriano, o equipamento determina em um tempo médio de seis horas, os padrões de sensibilidade aos antimicrobianos (GARCÍA, 2002).



Figura 4: Cartão para antibiograma específico para bactérias Gram Negativas (GN) fermentadoras ou não fermentadoras utilizado no VITEK 2.

Estes sistemas variam quanto ao grau de automatização, método de detecção (turbidimetria ou fluorometria), tempo de incubação e tempo de leitura. Cada equipamento tem instruções e recomendações específicas para o controle de qualidade e armazenamento dos cartões ou painéis de identificação e de sensibilidade, bem como da preparação do inóculo a ser utilizado (REINERT, 2009).

BIORREMEDIAÇÃO

A crescente demanda de produtos alimentícios provoca aumento na produtividade e quantidade de indústrias e, conseqüentemente, ocorre um aumento na produção de efluentes (FALCONE, 2009). Os efluentes originados de indústrias de processamento de produtos agropecuários apresentam elevada DBO (demanda bioquímica de oxigênio), grande quantidade de óleos e graxas (material flotável), alta concentração de sólidos sedimentáveis, sólidos

suspensos, nitrogênio orgânico e presença de microrganismos patogênicos (SCARASSATI et al., 2003).

Entre os componentes lipídicos da alimentação humana, estão óleos e gorduras, os quais geram aumento de efluentes gordurosos. Originados de residências, restaurantes e indústrias alimentícias, parte desses resíduos não recebem tratamento, ou sua destinação é inadequada, sendo jogados diretamente nos corpos d'água (FALCONE, 2009). Quando oriundos de indústrias, restaurantes e cozinhas industriais, ricos em lipídeos, os resíduos constituem um dos problemas sérios da gestão de efluentes, principalmente em países em desenvolvimento (STOLL; GUPTA, 1997).

As indústrias de alimentos como laticínios, frigoríficos e de alimentos em geral, geram grande quantidade de águas residuais, concentrando nestas a maior quantidade de contaminantes originados em seus processos. Por exemplo, as águas residuais da indústria láctea se caracterizam por possuir uma grande quantidade de matéria orgânica, especialmente gorduras e óleos (RUIZ; GIRALDO, 2007). Esse material lipídico presente nos efluentes apresenta baixa degradabilidade, provocando problemas operacionais nos processos biológicos de tratamento anaeróbio e aeróbio, em sistemas de tratamento de esgoto (JUNG et al., 2002).

Dentre os vários processos convencionais de tratamento de efluentes, podem-se destacar os tratamentos físicos, que são caracterizados por métodos de separação de fases (sedimentação, decantação, filtração, centrifugação ou flotação) dos resíduos. Além destes, existem os processos de troca iônica, oxidação química, biológicos e adsorptivos. Muitos processos utilizados em estações de tratamento de efluentes envolvem a adição de agentes coagulantes e floculantes, como polímeros e sais de ferro e de alumínio, porém os polímeros podem ser prejudiciais ao ambiente, devido à toxicidade de algumas moléculas (CRESPILHO et al., 2004).

Nos casos em que efluentes industriais oleosos são submetidos ao tratamento biológico, utilizando reatores de digestão anaeróbia do tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket - Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo), ocorrem diversos problemas operacionais, devido à formação de grande quantidade de sólidos hidrossolúveis, colmatação de camadas lipídicas que consiste na redução da área transversal dos espaços onde os

efluentes vão passar através do fluxo do sistema UASB, formação de caminhos preferenciais no leito de lodo e arraste da biomassa, com consequente perda de eficiência (LEAL et al., 2002). Além disso, são responsáveis pelo entupimento de tubulações e reservatórios, produzem odores desagradáveis e provocam transbordamento de fossas e caixas de gordura (WILLEY, 2001).

A degradação biológica de substratos orgânicos consiste em diversas reações metabólicas, que dependem de diferentes fatores como: tamanho das cadeias carbônicas presentes, quantidade de ramificações e insaturações constituídas na molécula e a complexidade estrutural da molécula. Portanto, ceras e óleos que possuem ácidos graxos com longas cadeias alquílicas, contendo insaturações, são metabolizados com maior facilidade por processos naturais biológicos, do que a gordura animal, que apresenta cadeias de mesmo tamanho, mas contêm somente ligações simples entre carbonos (VEIGA, 2003).

A utilização de microrganismos para tratar locais contaminados, com a finalidade de realizar a decomposição de poluentes específicos, é conhecida como biorremediação. A técnica de biorremediação pode ser aplicada de diferentes formas: a partir da utilização de microrganismos autóctones com a adição de agentes estimulantes do crescimento microbiano (bioestimulação) que fornece nutrientes como, moléculas orgânicas utilizadas como fonte de energia, oxigênio e biossurfactantes; ou através da inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaugmentação ou bioadição) (BENTO et al., 2003). O processo metabólico realizado pelos microrganismos é responsável pela redução da concentração ou eliminação dos poluentes no local, ou transformação dos poluentes em compostos de baixa toxicidade (YAKUBU, 2007).

A bioestimulação promove o crescimento dos microrganismos autóctones e consequentemente o aumento da atividade metabólica na degradação de contaminantes. Para se utilizar o processo de bioestimulação, deve existir no local contaminado uma população natural de microrganismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes, e as condições ambientais sejam suficiente para se obter altas taxas de atividade microbiológica dessa população (CUNNINGHAM; PHILP, 2000).

A bioaugmentação ou bioadição introduz consórcios específicos de microrganismos em um ambiente contaminado ou em um biorreator para iniciar o processo da biorremediação. Conforme a quantidade de contaminante exposto no meio, este estimulará ou não o aumento na quantidade de microrganismos. À medida que o contaminante é degradado, a população microbiana vai reduzindo e alcançando estabilidade (STRUTHERS et al., 1998).

Buscando minimizar os problemas causados pelas gorduras no tratamento de efluentes ou no ambiente, a utilização das enzimas lipolíticas (lipases) também possui grande importância, devido à sua capacidade biológica de hidrólise de óleos e gorduras, levando a um grande interesse para sua utilização em tratamento de efluentes gordurosos (MENDES et al., 2005). As lipases ou hidrolases de acilglicerol são enzimas que catalisam a hidrólise de éster de gorduras e óleos, que conduz à formação de glicerol e os ácidos graxos (LAZO et al., 2005). Uma das principais funções biológicas das lipases é que estas desempenham um papel importante na mobilização de lipídeos dentro das células dos microrganismos, bem como na transferência de lipídeos de um micro-organismo para outro (RIVERA; GARCIA, 2007).

Microrganismos produtores de lipases.

A produção de lipases pode ser observada em diferentes seres vivos (plantas, animais e microrganismos), contudo, as de origem microbiana, principalmente bactérias e fungos, representam a classe mais utilizada de enzimas em aplicações biotecnológicas (GUPTA et al, 2004).

A ampla capacidade catalítica das lipases leva a sua utilização nas mais diversas áreas. Essas lipases vêm sendo empregadas em indústrias de alimentos e laticínios, detergentes (SHARMA et al., 2001), têxtil, cosméticos, processamento de couro e pele (JAEGER; EGGERT, 2002), na obtenção de produtos farmacêuticos (MENDES et al., 2005), fabricação de papel, na síntese de biossurfactantes, biopolímeros e biodiesel, bem como no tratamento de águas residuárias (VERMA et al., 2012).

A degradação acelerada das gorduras com a utilização de microrganismos lipolíticos resulta na máxima relação custo/benefício em sistemas e estações de tratamento de esgoto e, principalmente, em caixas de

gordura residenciais e comerciais, tornando-os mais eficientes, reduzindo custos de manutenção e impactos ambientais (SEMIONATO, 2006).

Os microrganismos que apresentam alta atividade lipolítica constituem a principal fonte das lipases comercializadas para utilização em aplicações industriais. Portanto, formulações biológicas são utilizadas para remoção de poluentes contidos em efluentes industriais, em caixas de gordura, fossas sépticas, sumidouros, filtros biológicos e esgotos sanitários (VEIGA, 2003). Atualmente, uma grande diversidade de lipases microbianas são comercializadas por diferentes indústrias (Novozymes, Amano, Gist Brocades) (CASTRO et al., 2004)

As diferenças entre as enzimas lipases residem na sua função catabólica. A maioria das enzimas lipases catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis, agindo apenas na interface óleo/água, podendo catalisar também reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos. As lipases também catalisam a formação de amidas a partir de ésteres não ativados (BORNSCHEUER et al., 2002). As lipases microbianas são classificadas em três grupos, em função da relação da sua especificidade ao substrato (CASTRO; ANDERSON, 1995):

1) Lipases 1,3 específicas: liberam ácidos graxos resultantes da catálise, especificamente nas posições sn-1,3 dos acilgliceróis (CARVALHO et al., 2003).

2) Lipases ácido graxos específicas: são biocatalisadores hidrolíticos de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de triacilglicerol (CASTRO; ANDERSON, 1995).

3) Lipases não específicas: catalisam aleatoriamente a hidrólise de triacilglicerol para ácidos graxos livres e glicerol não apresentando especificidade com relação ao grupo acil ou à posição de esterificação no glicerol (CASTRO et al., 2004).

Entre alguns dos microrganismos utilizados para produção de enzimas comercialmente disponíveis, estão os gêneros *Serratia*, *Candida*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, entre outros (LEE et al., 2011). Segundo Sharma et al. (2001), dentre as enzimas comerciais, as lipases formam o terceiro maior grupo de vendas do mundo, depois das enzimas protease e carboidrases.

Um dos maiores problemas nos processos de biorremediação microbiana é a utilização de microrganismos autóctones que possam ter características patogênicas; mesmo essas bactérias apresentem boas características de degradação ou diminuição do contaminante, estas podem ser prejudiciais para a saúde humana e não seria possível utilizá-las nos sistemas de tratamento (SCARASSATI et al., 2003). Nesse sentido, uma das fases mais importantes nos processos de biorremediação é o isolamento e identificação de bactérias presentes nos ambientes contaminados, além de conhecer o perfil de susceptibilidade frente a antibióticos.

Barros et al. (2008) analisaram amostras de água de abastecimento de um abatedouro, em diferentes pontos do sistema do abate, dos afluentes e efluentes dos sistemas de tratamento e de três pontos do corpo receptor. Eles fizeram a identificação e sorotipificação de espécies de *Salmonella* isoladas nas águas de escaldadura, depenagem, pré-resfriamento e efluente nos abatedouros avícolas, e nas águas da lavagem do ambiente e no afluente, nos abatedouros suínos. A pesquisa evidenciou estes pontos como fontes de disseminação deste micro-organismo.

Garcia, (1993), isolou bactérias da espécie *Listeria* spp. isoladas de amostras de afluentes e efluentes de matadouros frigoríficos na cidade de Goiânia. Além de quantificar os microrganismos, ele concluiu que as indústrias já captavam a água contaminada por *Listeria* sp. e que o sistema de tratamento, composto por tratamento prévio (gradeação e desaeração), tratamento primário (decantação e separação de gorduras) e tratamento secundário (lagoas anaeróbias e facultativas), utilizado foi eficiente na diminuição da presença do patógeno.

3 Objetivos

Objetivo Geral

Comparar duas técnicas bioquímicas de identificação bacteriana e determinar o perfil de susceptibilidade a antibióticos de bactérias lipolíticas isoladas de efluentes residenciais, comerciais e industriais para aplicação desses microrganismos ambientais em processos de biorremediação.

Objetivos específicos

- Caracterizar morfológica e bioquimicamente as bactérias;
- Identificar através de provas bioquímicas convencionais e automatizadas os microrganismos;
- Comparar os resultados dos diferentes métodos de identificação de bactérias de origem ambiental;
- Determinar o perfil de susceptibilidade a antibióticos das bactérias isoladas;
- Sugerir algum isolado para ser utilizado possivelmente em processos de biorremediação.

4 Artigo

O artigo intitulado Comparação de técnicas de identificação bioquímica e perfil de susceptibilidade a antibióticos de bactérias lipolíticas isoladas de efluentes residenciais, comerciais e industriais está apresentado conforme as normas da Revista Journal of Microbiological Methods, Ciências Biológicas II - B2 e fator de impacto de 2.096.

COMPARISON OF BIOCHEMICAL IDENTIFICATION TECHNIQUES AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY PROFILE OF LIPOLYTIC BACTERIA FROM RESIDENTIAL AND INDUSTRIAL EFFLUENT

Andrés Felipe Gil Rave, Anelise Vicentini Kuss, Greice Hartwig Schwanke Peil,
Yohana Melania López Hernández, Silvia Regina Ladeira, Patrícia da Silva
Nascente, Pablo Villareal Villareal

Abstract

The biochemical identification techniques were made from clinical importance of microorganisms and there are few studies for biochemical identification of environmental bacteria. That sense, the objective of this study was to compare two methods of bacterial biochemical identification and determine the susceptibility profile of bacteria isolated from residential, commercial and industrial wastewater. 24 were used bacteria Bank bacterial of the Environmental Microbiology Laboratory, the Institute of Biology (IB), UFPEL, which were identified by conventional biochemical tests and by the automated system VITEK®2, in addition to determining the susceptibility profile to antibiotics also therethrough automated system. Six species of bacteria have been identified (*Raoutella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Raoutella* sp., and *Klebsiella oxytoca*) by conventional biochemical tests and three species of bacteria by the automated system VITEK®2 (*K. pneumoniae*, *S. marcescens* and *K. oxytoca*) and, in addition, the results of determination of antibiotic susceptibility profile showed that all the isolated (100%) were resistant to at least one antibiotic of the 18 tested by the automated system VITEK®2. The automated system VITEK®2 showed agreement in 19 isolates (79.17%) and difference in five isolates (20.83%) compared to the results obtained on conventional biochemical tests. There were obtained 79.7% agreement between the two biochemical identification methods analyzed. The results obtained in this study indicate the automated system VITEK®2 like a good method of determining the susceptibility and identification of bacteria of environmental origin.

Key-words: Biorremediation, VITEK®2, *S. marcescens*, microorganisms, biochemistry

1 Introduction

Actually diverse anthropic activities are increasing the residual levels of the world. There is a worry increase about the soil and water pollution growth, as a result of different industrial, mineralization, agriculture and domestic activities processes in the whole world (REN et al., 2009). The main environmental impacts due to the organic solid residuals are originated by the material fermentation, which leads to organic acid formation contributing to the generation of unpleasant odors and to the decrease of the oxygen dissolved in the water surface, harming the living creatures of the springs (GRAMINHA et al., 2008).

Meanwhile others residuals in increment, such as the rich oil and fat effluents, originated from the residences, restaurants and food industries can be seen due to the human feeding high demand. The lipids contained in the effluents are compounds that cause high impacts to the environment (MONGKOLTHANARUK; DHARMISTHITI, 2002). The greases and fats are highly stable, immiscible in water and are the result of industrial activities, mainly in the food process (HASAN et al., 2006). These contaminants are not soluble in water, so they stay in the surface resulting in a butterfat and skimming appearance (OLIVO et al, 2010).

The microorganism's metabolic process is responsible for the contaminants removal (MANDRI; LIN, 2007), reducing their concentration in the contaminated place (BELLO, 2007) or transforming the pollutants in low toxicity compounds (COLLA; COSTA, 2003).

During decades, bacteria has been routinely identified in laboratories using biochemical tests and by microscopic identification, that in general, need time to be performed, taking some hours to several days (MARTINY et al., 2012). The bacteria does not possess morphological characteristics enough to allowed their distinction, thus, the development of a variety of methodologies testing the metabolic or enzymatic reactions, enabling their grouping and identification to the genera or specie level. (BUSCH; NITSCHKO, 1999; ROMEU et al., 2010).

The manual analyses are delay techniques and the semi-automatic methods require high amounts of biologic material, being an important identification disadvantage for exigent microorganisms (MARTINY et al., 2012).

The VITEK (bioMérieux) System has been used as a useful tool for the identification of bacteria different groups through the miniaturized biochemical test in specific cards containing 64 fluorescent biochemical tests. Although the existence of few works reporting the use of this equipment to identify bacteria in the environment, he has been shown good results in the microorganism's identification in distinct ecosystems (SONG; LEFF, 2005).

The antibiotic resistant bacteria are disseminated in high amounts in the environment, as a result of the high indiscriminate use of antibiotics. The bacteria and their resistant gens had been detected in different environments, such as hospital sewage, domestic sewage and contaminated river water (KÜMMERER, 2001).

The indiscriminate medicament use can contribute in both chemical contamination by hospital wastes and in bacteria proliferation with high resistance, which turns these effluents very aggressive to the environment being exposed (ABREU et al., 2010).

Considering the importance that is the identification and determination of the environmental bacteria susceptibility profile, the aim of the present study was to determinate the antibiotic resistance or sensibility profile and to identify lipolytic bacteria isolated from residential, commercial and industrial effluents from the region of Pelotas/RS suggesting the use of microorganisms in the effluents bioremediation processes.

2 Material and Methods

Origin and sample processing

A study realized by Peil, (2015) verifies the lipolytic characteristics of the isolated bacteria used in this work.

Identification and morphologic and biochemical characterization

For the bacteria cellular morphological verification a Gram coloration technic with an optic microscopy visualization increased at 1000X was used, to determine the form, arrangement and classification Gram negative or Gram

positive was made. Subsequently, the biochemical tests and the identification card were selected to compare between the two identification techniques: The conventional and the automatized (VITEK®2).

Conventional biochemical tests

After the phenotypic colony identification and cellular identification through the Grams coloration by microscopic visualization, the conventional biochemical tests were made to determine the isolated bacteria classification according to the Gram negative bacterial identification protocol (Table 1) (BARROW; FELTHAM, 1993).

VITEK®2 System

The biochemical analyses were performed through the automated VITEK®2 system. The isolated bacteria were inoculated in BHI solid culture and incubated for 24 hours at 35°C. For the sample preparation, a homogeneous suspension with a density of microorganism was made with an optic density between 0.55 and 0.63, using a DensiCHEK™ VITEK®2. Caliper. Afterward the samples were collocated for the VITEK®2 posterior analyses. 48 biochemical tests were tested through the Gram Negative bacteria identification cards, specific for Gram negative bacteria.

Antibiotic susceptibility profile

The antibiotic susceptibility profile was also determinate using the automated VITEK®2 system. An aliquot of 145µL of the cellular suspension was added with an optic density between 0.55 and 0.63 in 3mL of saline solution at 0.85%. After that, the samples were collocated in the VITEK®2 which indicated the resistance or sensibility showed by the bacteria, through several antibiotic concentrations shown in the antibiogram cards.

The susceptibility profiles were performed with 18 antibiotics presented in the specific antibiogram AST cards specific for Gram negative bacteria.

3 Results and discussion

A total of 24 bacteria were isolated from residential (isolates 1, 2, 3, 4 and 5), commercial (isolates 6, 7, 8, 9 and 10) and industrials effluents (isolates 11-24), they had compatible Gram negative coloration at optic microscopy

examination. This result is similar to the study done by Lima Jr. (2009), at the Espírito Santo Federal University, who isolated 24 bacteria strains originated from residential and restaurant grease boxes, all the bacterial isolates were identified as Gram negatives bacteria.

In the literature, studies shown that a high number of bacteria found in the effluents treatment systems, are Gram negative (KANWAR; GOSWAMI, 2002). Being the most commonly, the genus *Acinetobacter* spp. (LIMA JR., 2009), *Aeromonas* spp. (OGINO et al., 2000), *Pseudomonas* spp. (SUGIMORI et al, 2002), *Burkholderia* spp. (BEAN et al, 2000) and *Serratia* spp. (MOHANAN et al., 2007). Also some Gram positive bacteria have been isolated from effluents being the genus *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., and *Propionibacterium* spp. (JAEGER; EGGERT, 2002).

Biochemical Conventional Identification

From the 24 bacteria identified as Gram negatives bacillus and cocci, the biochemical tests were executed to identify the genus and the specie for Gram negative bacteria according to Barrow and Feltham, (1993).

From the 24 analyzed bacteria, the biochemical conventional tests showed six bacteria species (Table 2), *Raoutella planticola* (1 isolate - 4,17%), *Klebsiella pneumonia* (1 isolate - 4,17%), *Serratia marcescens* (16 isolates - 66, 67%), *Enterobacter cloacae* (1 isolate - 4,17%), *Raoutella* sp. (2 isolates - 8,33%) and *Klebsiella oxytoca* (3 isolates - 12,5%) identified through the biochemical tests described in table 1.

Table 1: Results of biochemical tests performed to characterize genus of 24 Gram-negative bacteria isolated from residential, commercial and industrial effluents of region of Pelotas - RS

ISOLATED	BIOCHEMESTRY TEST														Bacterial Characterization
	GS	OX	Mc	CI	SIM	AR	CE	RA	XY	VP	LAC	OR	DU		
1	Gram -	-	+	+	-+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>K. oxytoca</i>	
2	Gram -	-	+	+	--+	-	d	-	d	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>	
3	Gram -	-	+	+	-+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>K. oxytoca</i>	
4	Gram -	-	+	+	--+	-	d	d	-	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>	

5	Gram -	-	+	+	--+	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
6	Gram -	-	+	+	--+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Raoutella</i> sp.
7	Gram -	-	+	+	--+	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
8	Gram -	-	+	+	--+	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
9	Gram -	-	+	+	--+	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
10	Gram -	-	+	+	--+	-	d	-	d	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
11	Gram -	-	+	+	--+	-	d	-	d	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
12	Gram -	-	+	+	--+	-	-	-	d	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
13	Gram -	-	+	+	--+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>K. oxytoca</i>
14	Gram -	-	+	+	--+	-	-	-	d	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
15	Gram -	-	+	+	--+	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
16	Gram -	-	+	+	--+	-	-	d	d	+	d	+	-	<i>S. marcescens</i>
17	Gram -	-	+	+	--+	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
18	Gram -	-	+	+	--+	-	-	-	-	+	-	+	d	<i>S. marcescens</i>
19	Gram -	-	+	+	--+	+	+	-	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i>
20	Gram -	-	+	+	--+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Raoutella</i> sp.
21	Gram -	-	+	+	--+	-	d	-	d	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
22	Gram -	-	+	+	--+	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>S. marcescens</i>
23	Gram -	-	+	+	---	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>K. pneumoniae</i>
24	Gram -	-	+	+	--+	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>R. planticola</i>

GS = Gram staining; OX = Oxidase; Mc = MacConkey medium; CI = Citrate; SIM = SIM medium; AR = Arabinose; CE = Cellobiose; RA = Raffinose; XY = Xylose; VP = Voges-Proskauer; LAC = Lactose; OR = Ornithine; DU = Dulcitol.

Biochemical identification by the VITEK®2 Automated System

The Gram Negative bacterial identification cards were used, specific for Gram negative bacteria. Of all 24 isolated bacteria Three species were identified through the Automatized VITEK®2 System, they were identified as *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (2 isolates – 8,33%), *S. marcescens* (17 isolates - 70,83%) and *K. oxytoca* (5 isolates - 20,83%). The characterization was made through the biochemical tests realized by the automatized System as described in table 2.

Table 2: Results of biochemical tests performed through the automated system VITEK®2 to characterize genus of 24 Gram-negative bacteria isolated from residential, commercial and industrial effluents of region of Pelotas - RS

ISOLATED	IDENTIFICATION	LEVEL OF CONFIDENCE
1	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	89% - Good identification
2	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
3	<i>K. oxytoca</i>	99% - Excellent identification
4	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
5	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
6	<i>K. oxytoca</i>	98% - Excellent identification
7	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
8	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
9	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
10	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
11	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
12	<i>S. marcescens</i>	94% - Very good identification
13	<i>K. oxytoca</i>	99% - Excellent identification
14	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
15	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
16	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
17	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
18	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
19	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
20	<i>K. oxytoca</i>	98% - Excellent identification
21	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
22	<i>S. marcescens</i>	99% - Excellent identification
23	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	91% - Good identification
24	<i>K. oxytoca</i>	99% - Excellent identification

Odeyemi et al. (2013) identified 32 bacteria through conventional biochemical methods, among them; *Klebsiella* sp. and *Serratia* sp., they were isolated from a restaurant water residual. Lin et al. (2012) identified through molecular testes, among diverse species, several *Klebsiella* spp., strains beyond four *Enterobacter* spp., strains from a total of 54 bacteria. These bacteria were isolated from 198 samples obtained from different places such as soil, residual water and polluted water.

Analyzing table 3, there is a difference in the results of the two identification methodologies. The Automatized VITEK®2 System showed concordance within 19 isolates (79,17%) and disagreeing within five isolates (20,83%) when compared to the results obtained in the conventional biochemical tests.

Table 3: Comparison of biochemical identification techniques of bacteria isolated from residential, commercial and industrial effluents

ISOLATED	BIOCHEMESTRY TEST	VITEK®2
1	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>
2	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
3	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>
4	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
5	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
6	<i>Raoutella</i> sp.	<i>K. oxytoca</i>
7	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
8	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
9	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
10	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
11	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
12	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
13	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>
14	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
15	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
16	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
17	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
18	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
19	<i>E. cloacae</i>	<i>S. marcescens</i>
20	<i>Raoutella</i> sp.	<i>K. oxytoca</i>
21	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
22	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
23	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>
24	<i>R. planticola</i>	<i>K. oxytoca</i>

The concordance of the results of our study goes against those obtained by Bamford et al. (2010) when the same methodologies were compared. In this study clinical environmental isolates belonging to the *Enterobacteriaceae* family were used; the authors determined a highest concordance (93%) in the results obtained, when compared with the ones from our study, this might be due because of the differences between isolated bacteria from different environments.

The first isolate presented a difference in the results of identification when the two methodologies were used. The biochemical tests identified the bacteria 1 as *K. oxytoca* and the Automatized VITEK®2 System identified as *K. pneumoniae* ssp. *Pneumoniae*. The results obtained by Schreckenberger et al. (2005) also showed a difference in the species identification in the *Klebsiella* genera, mainly between *K. oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*, when several biochemical identification methodologies were used.

To differentiate between this two species, the degradation of ornithine, dulcitol and arabinose was made through conventional biochemical tests and in turn the ornithine and the 5-ketogluconate degradation were analyzed through the Automatized VITEK®2 System. These characteristics were studied by Drancourt et al. (2001) to differentiate species from *Klebsiella* and *Raoutella* genera.

The specie *K. oxytoca* (isolate 13) identified by the VITEK®2 showed a negative ornithine, positive dulcitol and positive arabinose results, according with the results obtained in the conventional tests for the isolate number 13 (*K. oxytoca*).

On the other hand, *K. pneumoniae* ssp. *Pneumonia* presented as results in the biochemical tests, positive ornithine, negative dulcitol and negative arabinose, disagreeing with the results obtained in the conventional biochemical tests, but agreeing with the results obtained by the VITEK®2.

The two species from *Raoutella* genera; *Raoutella planticola* and *Raoutella* sp identified through biochemical tests showed discrepancy when compared with the result obtained through the Automatized VITEK®2 System, which identified all of the isolates as bacteria from the specie *K. oxytoca*.

Based on the 16s rRNA *rpoB* gene molecular sequence analysis Drancourt et al. (2001) proposed that *Klebsiella* genera had to be divided in two

genera; *Klebsiella* and *Raoutella*, and that the specie *K. oxytoca* should be left as a monophyletic specie. Beyond molecular analysis, the authors determined some differences between species from these genera, based on Tthe biochemical test.

K. oxytoca bacteria is characterized by having dulcitol, L-Tartrate and 3-O-Methyl-D-glucose negative degradation, meanwhile, the bacteria; *Raoutella ornithinolytica*, *Raoutella planticola* and *Raoutella* sp. are dulcitol and L-Tartrate negative and 3-O-Metil-D-glucose positive, which are typical characteristics to separate *K. oxytoca* from *Raoutellas* sp. (DRANCOURT et al., 2001).

Others authors report the importance of doing histamine production tests to differentiate this bacteria. In the year 2002 Kanki et al. performed histamine production assays through conventional biochemical tests and molecular analyses, the author concluded that the species from *Raoutella* genera can produce histamine in contrast with the species of the genera *Klebsiella*. In our work, through the use of conventional biochemical tests we differentiated the *Klebsiella* and *Raoutella* species through the dulcitol degradation, the VITEK®2 doesn't realized this test.

Meanwhile, the VITEK®2 realized the histamine production test, in which all the isolates were negative and through conventional biochemical tests they were identified as the genera *Raoutella*. These results explained the discrepancy of the obtained results between the two methodologies used.

About the 24 isolates, the bacteria also showed difference between the two identification methodologies tests. The conventional biochemical tests identified the isolates as *Enterobacter cloacae* and the Automatized VITEK®2 System identified them as *Serratia marcescens*. In the biochemical tests *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*, were differentiated through the arabinose and celobiose degradation, but the VITEK®2 only evaluated the celobiose degradation.

In the obtained results there was difference in the celobiose degradation between the performed tests realized by the VITEK®2 and the conventional tests. The bacteria *Enterobacter cloacae* was celobiose positive, obtained result in the conventional biochemical tests and the bacteria *Serratia marcescens* is celbiose negative, which corresponds to the result obtained in the VITEK®2, this

explain the difference in the results obtained through the two tested methodologies.

The principal failures obtained in the VITEK®2 GNI card from, were the carbohydrates; arabinose, cellobiose, sorbitol and arginine decarboxylation in all bacterial species (D'AZEVEDO et al., 2004).

The conventional biochemical characterization performed in this study failed to reach up to the specie identification of two of the 24 identified isolates (8,33%) being as the genera *Raoutella* sp. After researching the schemes proposed in the literature. The schemes used by diverse authors were based in isolates from clinical source and little is known about the biochemical characterization of environmental isolates (FUNKE et al., 1997).

Maybe, a huge difficulty associated with the bacterial species identification based on phenotypic characteristics, relays on the fact of the divergence or convergence occurrence.

The divergence occurs in some species lineages, genetically identical, but with different phenotypic characteristics. The convergence occurs in different species lineages, genetically different, but with a similar phenotypic behavior. In both situations, the phenotypic test resulted in a wrong identification (SIQUEIRA Jr; ROÇAS, 2005).

Although the biochemical tests revealed high efficiency for the environmental bacteria identification, such as the identification of the specie *Serratia marcescens*, a convergence possibility in the tests cannot be discarded, according to the literature (SIQUEIRA Jr; ROÇAS, 2005) leading to this type of discrepancies when compared biochemical identification methods.

Between the available microbial identification miniaturized systems, based on the specific microorganism's substrates metabolism, the Automatized VITEK®2 System stands out (JORDÁ et al., 2005). The results obtained in this study shows that the VITEK®2 is a reliable method for the enterobacteria identification (100% of the samples) mainly the specie *Serratia marcescens*. Better results were obtained in this study when compared to those obtained by O'Hara et al. (2005) who analyzed and identified 86% of the enterobacteria through the same system.

The environmental diversity is directly related with the environmental balance, which is directly affected by the urban and industrial residuals release.

Some microorganism's species can act as decomposers in bioremediation process, helping in the recovery of contaminated areas (POLONIO et al., 2014). The isolation and identification of new microorganisms with a high enzyme production potential is of great importance, since they exhibit a wide applicability and are efficient in bioremediation process of contaminated places. Beyond the efficient effluent treatment contenting a high oil and fat concentration (GOPINATH et al., 2013).

Antibiotic susceptibility profiles

The antibiotic susceptibility profiles of all the 24 isolated bacteria were determinate through the automated system VITEK®2 and with the used of antibiogram AST cards, specific for Gram negative bacteria.

The results showed that all of the isolates (100%) presented resistance for at least one antibiotic of all the 18 antibiotics tested by the automated VITEK®2 system and all the identified bacteria of the same specie showed the same susceptibility profile (Tables 4, 5 and 6). The antibiotic resistance seen in this study was high, when compared with Zambrano et al. (2002), were they determinate the antibiotic susceptibility profile from bacteria isolated of residential effluents founding that 90% of the bacteria from the family *Enterobacteriaceae* showed resistance for at least one antibiotic.

Table 4: Susceptibility profile of the species *S. marcescens* analyzed by the automated system VITEK®2

PROFILE SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS OF <i>S. marcescens</i>			
ANTIBIOTICS	MIC	INTERPRETATION	LEVEL OF CONFIDENCE
BLSE	-	-	-
AMPICILLIN	-	-	-
AMPICILLIN/SULBACTAM	-	-	-
PIPERACILLIN/TAZOBACTAM	≤4	S	Consistent
CEFUROXIME	16	R	Consistent
CEFUROXIME AXETIL	16	R	Consistent
CEFOXITIN	8	S	Consistent
CEFTAZIDIME	≤1	S	Consistent
CEFTRIAZONE	≤1	S	Consistent
CEFEPIME	≤1	S	Consistent
ERTAPENEM	≤0,5	S	Consistent

IMIPENEM	<=0,5	S	Consistent
MEROPENEM	<= 0,25	S	Consistent
AMIKACIN	<=2	S	Consistent
GENTAMICIN	<=1	S	Consistent
CIPROFLOXACIN	<= 0,25	S	Consistent
TIGECYCLINE	1	S	Consistent
COLISTIN	>=16	R	Consistent

- = It was not analyzed by the automated system VITEK®2; S = Sensitive; R = Resistant; MIC = Minimum Inhibition Concentration

Table 5: Susceptibility profile of the species *K. oxytoca* analyzed by the automated system VITEK®2

PROFILE SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS OF <i>K. oxytoca</i>			
ANTIBIÓTICS	MIC	INTERPRETATION	LEVEL OF CONFIDENCE
BLSE	-	-	-
AMPICILLIN	16	R	Consistent
AMPICILLIN/SULBACTAM	4	S	Consistent
PIPERACILLIN/TAZOBACTAM	<=4	S	Consistent
CEFUROXIME	<=1	S	Consistent
CEFUROXIME AXETIL	<=1	S	Consistent
CEFOXITIN	<=4	S	Consistent
CEFTAZIDIME	<=1	S	Consistent
CEFTRIAZONE	<=1	S	Consistent
CEFEPIME	<=1	S	Consistent
ERTAPENEM	<=0,5	S	Consistent
IMIPENEM	<= 0,25	S	Consistent
MEROPENEM	<= 0,25	S	Consistent
AMIKACIN	<=2	S	Consistent
GENTAMICIN	<=1	S	Consistent
CIPROFLOXACIN	<= 0,25	S	Consistent
TIGECYCLINE	<=0,5	S	Consistent
COLISTIN	<=0,5	S	Consistent

- = It was not analyzed by the automated system VITEK®2; S = Sensitive; R = Resistant; MIC = Minimum Inhibition Concentration

Table 6: Susceptibility profile of the species *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* analyzed by the automated system VITEK®2

PROFILE SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS OF <i>K. pneumoniae ssp. pneumoniae</i>			
ANTIBIÓTICS	MIC	INTERPRETATION	LEVEL OF CONFIDENCE
BLSE	-	-	-
AMPICILLIN	16	R	Consistent
AMPICILLIN/SULBACTAM	4	S	Consistent

PIPERACILLIN/TAZOBACTAM	≤ 4	S	Consistent
CEFUROXIME	≤ 1	S	Consistent
CEFUROXIME AXETIL	≤ 1	S	Consistent
CEFOXITIN	≤ 4	S	Consistent
CEFTAZIDIME	≤ 1	S	Consistent
CEFTRIAXONE	≤ 1	S	Consistent
CEFEPIME	≤ 1	S	Consistent
ERTAPENEM	$\leq 0,5$	S	Consistent
IMIPENEM	$\leq 0,25$	S	Consistent
MEROPENEM	$\leq 0,25$	S	Consistent
AMIKACIN	≤ 2	S	Consistent
GENTAMICIN	≤ 1	S	Consistent
CIPROFLOXACIN	$\leq 0,25$	S	Consistent
TIGECYCLINE	$\leq 0,5$	S	Consistent
COLISTIN	4	R	Consistent

- = It was not analyzed by the automated system VITEK®2; S = Sensitive; R = Resistant; MIC = Minimum Inhibition Concentration

All the isolates identified as *S. marcescens* (100%) showed resistance to three kinds of antibiotics (cefuroxime, cefuroxime (axetil) and colistin), two of them belonging to the cephalosporin group (cefuroxime and cefuroxime (axetil)) in a MIC ≥ 16 and showed a sensitivity to the rest of the antibiotics tested by the automated VITEK®2 system.

Meanwhile, the bacteria identified as *K. pneumonia* spp. *pneumonia* showed resistance to two of the antibiotics (ampicillin in a MIC = 16 and colistin in a MIC = 4) and was sensitive to the rest of the antibiotics tested by the automated VITEK®2 system.

All the isolates identified as *K. oxytoca* shown resistance to one antibiotic (ampicillin) in a MIC = 16 and was sensitive to all the other antibiotics tested by the automated system VITEK®2.

This results are contradict when compared with those obtained by Pereira et al., (2013) who evaluated the antibiotic susceptibility profile for the following bacteria species: *K. pneumonia*, *K. oxytoca* and *S. marcescens*, isolated from the Sistema Municipal de Abastecimento de Água de São José do Rio Preto-SP. This evaluated species not showed any resistance to the evaluated antibiotics.

This study showed the resistance prevalence to cephalosporins which belongs to the β -lactam class, interacting with the Penicillin binding proteins (PBP) preventing the bacteria cell wall formation. The cephalosporins are one of the most commonly antibiotics used in different areas, such as human medicine and veterinary medicine, been available for a long period of time in the market, this antibiotics ultimately had made selected disseminators resistance factors or ending in selecting disseminator's resistance factors. Once the antibiotics are discarded in the environment they can be related with the presence of resistant microorganisms against these antibiotics (OLIVEIRA, 2011).

In this study, it was not possible to observe a multiresistant bacteria being a good microorganism characteristic being useful in the effluents treatment systems or in the bioremediation process. Other authors affirmed that environmental multiresistant bacteria populations, especially those in a contaminated environment can increase due to the highly presence of resistant bacteria in the industrial and hospital effluents and because of the different types of genetic material exchange (ANDERSEN, 1993), such as the horizontal gene transfer, generating an important risk to the human health.

There are few studies about the bacteria susceptibility profile presented in effluents (BAQUERO et al., 2008). Li et al. (2009) isolated bacteria from effluents of a penicillin producer industry and evaluated their susceptibility profile. The authors determine that some species from the family *Enterobacteriaceae* did showed penicillin resistance.

Li et al. (2010), determine the presence of oxytetracycline resistant bacteria in effluents from industries producers of this antibiotic and also from a river where the effluent was released. The analyses showed the presence of species from the genera *Klebsiella* spp. and other oxytetracycline resistant enterobacteria species.

The antibiotic resistant bacteria reached the aquatic ecosystems through the dissemination of animals and persons. These bacteria can capture resistant genes from carrying bacteria (ALONSO et al., 2001). Besides that, many antibiotics from the industry are present in effluents that can reach these aquatic ecosystems disturbing the original microbiota (CABELLO, 2006).

The bacteria, including in the one in natural environment without antibiotic, can transport a huge number of resistance genes (ALLEN et al., 2009). It is difficult to explain the antibiotics role in natural ecosystems from an anthropocentric point of view, since they are based on a clinical fundament, for example an antibiotic efficiency to treat a particular infection or the removal of a resistance pathogenic agent.

There are studies that the antibiotics have another role in nature; having a regulatory or signaling molecules behavior (SHINER et al., 2005) in certain metabolic process of the microbiota in a specific environment, but this function can be done in subclinical concentrations of this molecules (BAQUERO et al., 2008).

The microorganism's metabolism shows the capacity to eliminate residuals and to produce useful substances. Therefore the biodegradation consists in an important event to improve the oil pollution in the environment, minimizing the environmental impact (GOPINATH et al., 2013).

In this sense, diverse microorganisms can be efficient in the treatment of contaminated places due to their biotechnological applications.

To obtain efficient bacteria that can be used in the bioremediation process, there must be consider some characteristics form the isolated microorganisms, one of this is characteristics is the pathogenicity. The coliforms bacteria are a high diversity heterogeneous group in terms of genera and specie. All of them belong to the *Enterobacteriaceae* family (EDBERG et al., 2000).

Most of the coliforms definitions are based on the common biochemical characteristics (ROMEU et al., 2010). The coliform group includes the following genera: *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Serratia* spp. Four of this genera (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Serratia* spp.) are founded in high quantity in the environment (water resources, vegetation and soil) they are not necessarily associated with fecal contamination and they do not represent necessarily a healthy risk (ALLEN, 1996). The obtainment of nonpathogenic bacteria helps to improve the contaminant bioremediation process without creating another problem to the environment.

The residuals treatment technics using biological systems involve a wide range of knowledge in relation to the microbial ecology and the engineer process (SIQUEIRA et al., 1994), thus aiming the knowledge and the identification of the microbiota present in the effluents to create favorable growing conditions and microbial activities able to promote the decontamination of damage areas or industrial wastes.

The biotechnological use of live organisms for the removal or reduction of pollutants in the environment is a more effective and adequate alternative from the ecologic point of view, when compared to the chemical and physical process used in the recovery of contaminated areas (GAYLARDE et al., 2005).

4 Conclusion

In conclusion the automated VITEK®2 system presented concordance in almost 80% of the identified and characterized samples by the conventional systems, showing that it is an appropriated system to identify environmental bacteria. The antibiotic susceptibility profile of bacteria isolated from effluents indicated resistance to at least one of the two antibiotics tested, being an important characteristic of the isolated lipolytic bacteria possibly used in residential, commercial and industrial bioremediation effluents process with high lipid content.

5. Referencias

Allen M. La importancia para la salud pública de los indicadores bacterianos que se encuentran en el agua potable. Reunión sobre la calidad del agua potable. 1996; CEPIS. OPS. OMS. Lima, Perú.

Abreu, T. E.; Pretto, A. J.; Oliveira, A.; Aranhén, R.; Nakamura, C. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. *Acta scientiarum. Technology*, v.32, n.1, p.1-5, 2010.

Allen, H. K.; Moe, I. A.; Rodbumrer, J.; Gaarder, A.; Handelsman J. Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote alaskan soil. *The isme journal*, v.3, n.2, p.243-251, 2009.

Alonso, A.; Sánchez, P.; Martínez, J. Environmental selection of antibiotic resistance genes. Minireview. *Environmental microbiology*, v.3, n.1, p.1-9, 2001. Andersen, S. Effects of waste water treatment on the species composition and antibiotic resistance of coliform bacteria. *Current microbiology*, v.26, n.2, p.97-103, 1993.

Baquero, F.; Martinez, J. L.; Canton, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, v.19, n.3, p.260-265, 2008.

Bello, M, Y. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African journal of biotechnology*, vol.6, n.24, p.2735-2739, 2007.

Busch, U.; Nitschko, H. Methods for the differentiation of microorganisms. *Journal of chromatography b. Science applications*, v.722, n.1, p.263-278, 1999.

Cabello, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problema for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, v.8, n.7, p.1137-1144, 2006.

Colla, I. M.; Costa, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, vol.13, p.85-103, 2003.

Drancourt, M.; Bollet, C.; Carta, A.; Rousselier. Phylogenetic analyses of klebsiella species delineate klebsiella and raoultella gen. Nov., with description of raoultella ornithinolytica comb. Nov., raoultella terrigena comb. Nov. And raoultella planticola comb. Nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v.51, n.3, p.925-932, 2001.

D'azevedo, P. A.; Cantarelli, V.; Inamine, E.; Superti, S.; Dias, G. A. Avaliação de um sistema automatizado na identificação de espécies de enterococcus. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*, v.40, n.4, p.237-239, 2004.

Edberg, S. C.; Rice, E. W.; Karlin, R. J.; Allen, M. J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symposium Series: Society for Applied Microbiology*, v.29, p.106-116, 2000.

Funke, G. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clinical microbiology reviews*, v.10, n.1, p.125-159, 1997.

Gaylarde, C. C.; Bellinaso, M. L.; Manfio, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotechnologia Ciência*, n. 34, p 36-43, 2005.

Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Lakshmipriya, T., Hilda, A., 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed Research International* 2013, 1-10.

Graminha, E. B. N.; Gonçalves, A. Z. L.; Pirota, R. D. P. B.; Balsalobre, M. A. A.; Gomes, E. R. S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v.144, n.12, p.1-22, 2008.

Hasan, F.; Ali, S. A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and microbial technology*, v.39, n.2, p.235-251, 2006.

Jaeger, K. E.; Eggert, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, n.4, p.390-397, 2002.

Jaeger, K. E.; Ransac, S.; Dijkstra, B. W.; Colson, C.; Heuvel, M. V.; Misset, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, v.15, n.1, p.29-63, 1994.

Jordá, I.; Vila, A.; Lanza, A.; Bonvehí, P.; Nazar, J.; Mikietuk, A.; Labat, R.; Smayevsky, J. Utilidad del sistema vitek en la identificación bacteriana y su estudio de sensibilidad antimicrobiana. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, v.39, n.1, p.19-25, 2005.

Kanwar, L.; Goswami, P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, n.6, p.727-735, 2002.

Kümmerer, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospital in relation to other sources - a review. *Chemosphere*, v.45, n.6, p.957-969, 2001.

Li, D.; Yang, M.; Hu, J.; Zhang, J.; Liu, R.; Gu, X.; Zhang, Y.; Wang, Z. Antibiotic resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environmental microbiology*, v.11, n.6, p.1506-1517, 2009.

Lima JR, A, F. (2009). Biodegradação e atividade lipolítica em resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

Lin, J. F.; Lin, Q.; Li, J.; Fei, Z. A.; Li, X. R.; Xu, H.; Qiao, D. R.; Cao, Y. Bacterial diversity of lipase-producing strains in different soils in southwest of China and characteristics of lipase. *African Journal of Microbiology Research*, v.6, n.16, p.3797-3806, 2012.

Mandri, T.; Lin, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, v.6, n.1, p.23-27, 2007.

Martiny, D.; Busson, I.; Wybo, I.; El Haj, H.; Dediste, A.; Vandenberg, O. Comparison of the microflex It and vitek ms systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, v.50, n.4, p.1313-1325, 2012.

Mohanan, S.; Maruthamuthu, S.; Muthukumar, N.; Rajesekar, A.; Palaniswamy, N. Biodegradation of palmarosa oil (green oil) by *Serratia marcescens*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v.4, n.2, p.277-281, 2007.

Mongkolthanaruk, W; Y Dharmisthiti, S. Biodegradation of lipidic wastewater by a mixed bacterial consortium. *International biodeterioration & biodegradation*, v.50, n.2, p.101-105, 2002.

Odeyemi, A. T.; Aderiye, B. I.; Bamidele O. S. Lipolytic activity of some strains of *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus* spp. from restaurant wastewater and receiving stream. *Journal of Microbiology Research*, v.3, n.1, p.43-52, 2013.

Ogino, H.; Nakagawa, S.; Shinya, K.; Muto, T.; Fugimura, N.; Yasuda, M.; Ishikawa, H. Purification and characterization of organic solvent stable lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.89, n.5, p.451-457, 2000.

Oliveira, V. D. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas nas águas do arroio Dilúvio. 2011. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Instituto De Ciências Básicas Da Saúde, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS.

Olivo, V, A; Leos, M, M; Campos, S, M. Extracción de grasas y aceites en los efluentes de una industria automotriz. *Conciencia tecnológica*, v.40, p.29-34, 2010.

Peil, G.; H.; S. Bioprospecção de microrganismos lipolíticos obtidos de efluentes industriais. 2015. 54f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Pereira, O. L. Perfil de resistência aos antimicrobianos em coliformes isolados do Sistema Municipal de Abastecimento de Água de São José do Rio Preto-SP. 2013. 83f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, SP.

Polonio, C. J.; Polli, D. A.; Bulla, C. M.; Rosseto, P.; Dos Santos, M. C.; Rhoden, A. S.; Pamphile, A. A.; Conte, H. Potencial biorremediador de microrganismos: Levantamento de resíduos industriais e urbanos tratáveis no município de Maringá-PR. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v.3, n.2, p.31-45, 2014.

Ren, W.; Li, P.; Geng, Y.; Li, X. Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*, v.167, n.1, 164-169, 2009.

Romeu, B.; Salazar, P.; Navarro, A.; Lugo, D.; Hernández, U.; Rojas, N.; Eslava, C. Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. CENIC, v.41, p.1-9, 2010.

Schreckenberger, P. C.; Ristow, k. L.; krilcich, A. M. Comparison of the vitek legacy, vitek 2 colorimetric and phoenix systems for identification of fermenting and non-fermenting bacteria of clinical origin. As presented at the 105th general meeting of the american society for microbiology, washington, dc, usa. American society for microbiology, 2005.

Semionato, S. Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura da ete-ufes. 2006. 82f. Dissertação (mestrado em engenharia ambiental)-centro tecnológico, universidade federal do espírito santo, vitória.

Shiner, E. K.; Rumbaugh, K. P.; Williams, S. C. Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acylhomoserinelactones. FEMS Microbiology Reviews, v.29, n.5, p.935-947, 2005.

Siqueira, J. O.; Moreira, F. M. S.; Grisi, B. M.; Hungria, M.; Araujo, R. S. Microrganismos e processos biológicos do solo: Perspectiva ambiental. Brasília: EMBRAPA, SPI, p. 142, 1994.

Siqueira Jr, J. F.; Roças, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 1-current molecular technologies for microbiological diagnosis. Journal of endodontics, v.31, n.6, p.411-423, 2005.

Sugimori, D.; Nakamura, M.; Mihara, Y. Microbial degradation by *Acinetobacter* sp. strain SOD-1. Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.66, n.7, p.1579-1582, 2002.

Zambrano, J. L.; Botero, I.; Cavazza, M. E.; Avila, M. Resistencia a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aguas residuales crudas y tratadas de lagunas de estabilización con fines de reuso en agricultura. Revista de la sociedad venezolana de microbiología, v.22, n.1, p.44-50, 2002.

5 Conclusão

- Os resultados obtidos neste trabalho indicam o sistema automatizado VITEK®2 apresentou concordância em quase 80% das amostras identificadas e caracterizadas pelos sistemas convencionais.

- O sistema automatizado VITEK®2 é uma ferramenta apropriada para identificar e determinar o perfil de susceptibilidade de bactérias ambientais.

- Não foram identificadas bactérias multirresistentes através da determinação do perfil de susceptibilidade dos 24 isolados analisados.

- As 24 bactérias isoladas de efluentes residenciais e industriais podem ser sugeridas para posteriores estudos que possam avaliar outras características importantes de microrganismos utilizados em processos de biorremediação de efluentes residenciais, comerciais e industriais.

6 Perspectivas

Neste contexto, os trabalhos que privilegiem a identificação e determinação de resistência a antibióticos de bacterianas de ambientes contaminados, como foi apresentado, permitem sugerir microrganismos para serem avaliados como possíveis remediadores. Com isso, abre-se a possibilidade de manipulação dos processos de biorremediação, como, melhoramento da eficiência de degradação, bioaumentação e aplicação de biotecnologia em campo, focadas em bactérias e contaminantes previamente conhecido.

7 Referencias

- ABREU, T. E.; PRETTO, A. J.; OLIVEIRA, A.; GRANHEN, R.; NAKAMURA, C. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. **Acta Scientiarum. Technology**, v.32, n.1, p.1-5, 2010.
- ALDRIDGE, C.; JONES, P.; GIBSON, S.; LANHAM, J.; MEYER, M.; VANNEST, R.; CHARLES, R. Automated microbiological detection/identification system. **Journal of Clinical Microbiology**, v.6, n.4, p.406-413, 1977.
- ALLEN, M. La importancia para la salud pública de los indicadores bacterianos que se encuentran en el agua potable. Reunión sobre la calidad del agua potable. 1996; CEPIS. OPS. OMS. Lima, Perú.
- ALLEN, H. K.; MOE, L. A.; RODBUMRER, J.; GAARDER, A.; HANDELSMAN J. Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan Soil. **The ISME Journal**, v.3, n.2, p.243-251, 2009.
- ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍNEZ, J. Environmental selection of antibiotic resistance genes. Minireview. **Environmental Microbiology**, v.3, n.1, p.1-9, 2001.
- ANDERSEN, S. Effects of waste water treatment on the species composition and antibiotic resistance of coliform bacteria. **Current Microbiology**, v.26, n.2, p.97-103, 1993.
- ANDRADE, R. B.; GEMELLI, T.; ONDER, D. K.; CRISTINA, T.; BRITO, A. A. L., BARBOZA, B. G., BRITO, B. G. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogene*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, p.741-750, 2010.
- ARNOLD, W. M.; WEAVER, R. H. Quick microtechniques for the identification of cultures. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.33, n.10, p.1334-1337, 1948.
- BAMFORD, C.; GOODWAY, J.; HOFFMANN, R. Rapid identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from blood cultures using the Vitek® 2 system. **Southern African Journal of Infectious Diseases**, v.25, n.3, p.28-31. 2010.

BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L.; CANTON, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current opinion in Biotechnology**, v.19, n.3, p.260-265, 2008.

BARROS, S. L.; AMARAL, A. L.; LORENZON, S. C.; JÚNIOR, J.; NETO, M.; GONÇALVES, J. Isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* sp. nas águas residuárias de abatedouros avícolas e suínícolas. **Higiene Alimentar**; v.22, n.158, p.79-87, 2008.

BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria**. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 216 p.

BATISTA, M. A.; SANTOS, M. I.; MENEZES, L. S.; CARNEIRO, M. P. CÂNDIDO, A. L. Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* sp. multirresistentes isoladas de efluentes urbanos em Aracaju, Sergipe. **Biologia Geral e Experimental**, v.7, n.1, p.15-18, 2007.

BELLO, M, Y. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, vol.6, n.24, p.2735-2739, 2007.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER JR., W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol.34, n.1, p.65-68, 2003.

BERKE, J.; TIerno, P. Comparison of efficacy and cost-effectiveness of BIOMIC VIDEO and VITEK antimicrobial susceptibility test systems for use in the clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.8, p.1980-1984, 1996.

BORNSCHEUER, U. T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, S. H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v.20, n.10, p.433-437, 2002.

BOU, G.; OLMOS, A. F.; GARCÍA, C.; NIETO, J. A.; VALDEZATE, S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.29, n.8, p.601-608, 2011.

BOURBEAU, P. P.; HEITER, B. J. Comparison of VITEK GNI and GNI+ cards for identification of gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.9, p.2775-2777, 1998.

BUSCH, U.; NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. **Journal of Chromatography B. Science Applications**, v.722, n.1, p.263-278, 1999.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problema for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v.8, n.7, p.1137-1144, 2006.

CALVINHO, L. F.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.61, n.1, p.93-110, 1998.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p.75-80, 2003.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine Chemical by Biotransformation using lipases. **Química Nova**, v.18, n.6, p.544-554, 1995.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

CHRISTENSEN, W. B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **Journal of Bacteriology**, v.52, n.4, p.461-466, 1946.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, vol.13, p.85-103, 2003.

CRESPILHO, F. N.; SANTANA, C. G.; REZENDE, M. O. O. Tratamento de efluente da indústria de processamento de coco utilizando eletroflotação. **Química Nova**, v.27, n.3, p.387-392, 2004.

- CUNNINGHAM, C. J., PHILP, J. C. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. **Land Contamination & Reclamation**, v.8, p. 261-269, 2000.
- DOERN, G. V.; BRUEGGEMANN, A. B.; PERLA, R.; HALKIAS, D.; JONES, R. N.; SAUBOLLE, M. A. Multicenter laboratory evaluation of the bioMerieux VITEK antimicrobial susceptibility testing system with 11 antimicrobial agents versus members of the family Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.8, p.2115-2119, 1997.
- DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A.; ROUSSELIER. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.3, p.925-932, 2001.
- D'AZEVEDO, P. A.; CANTARELLI, V.; INAMINE, E.; SUPERTI, S.; DIAS, G. A. Avaliação de um sistema automatizado na identificação de espécies de *Enterococcus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, n.4, p.237-239, 2004.
- EDBERG, S. C.; RICE, E. W.; KARLIN, R. J.; ALLEN, M. J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **Symposium Series: Society for Applied Microbiology**, v.29, p.106-116, 2000.
- FALCONE, C. O. **Avaliação de lipase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento**. 2009. 70f. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental)-Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- FRANZOLIN, M. R. Fundamentos da identificação bioquímica das bactérias. In: TRABULSI, L. R. e ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. p.463-473.
- FUNKE, G.; Clinical microbiology of Coryneform bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.1, p.125-159, 1997.

GARCÍA, P. Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in Vitro. **Revista chilena de infectología**, v.19, n.2, p.96-100, 2002.

GARCIA, C. A. NMP de *Listeria sp.* em afluentes e efluentes de matadouros frigoríficos de bovinos em Goiás. **Anais das Escolas de Agronomia e de Veterinária**, v.23, n.1, p.73-83, 1993.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência**, n. 34, p 36-43, 2005.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-10. 2013.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; GOMES, E. R. S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, n.12, p.1-22, 2008.

HARAKEH, S.; YASSINE, H.; EI-FADEL, M. Antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. **Environmental Pollution**, v.143, n.2, p.269-277, 2006.

HARBARTH, S.; GARBINO, J.; PUGIN, J.; ROMAND, J. A.; LEW, D.; PITTET, D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. **The American Journal Of Medicine**, v.115, n.7, p.529-535, 2003.

HARDY, A. V.; MASON, R. P.; MARTIN, G. A. The dysenteries in the armed forces. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.1, n.1, p.171-175, 1952.

HASAN, F; ALI, S, A; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.2, p.235-251, 2006.

HIRSH, R.; TERNES T.; HABERERA, K.; KRATZB, L. K. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **The Science of the Total Environmental**, v.225, p.109-118, 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.4, p.390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVEL, M. V.; MISSET, O. **Bacterial lipases. FEMS Microbiology Reviews**, v.15, n.1, p.29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; REETZ, M, T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.16, n.9, p.396-403, 1998.

JORDÁ, L.; VILA, A.; LANZA, A.; BONVEHI, P.; NAZAR, J.; MIKIETUK, A.; LABAT, R.; SMAYEVSKY, J. Utilidad del sistema Vitek en la identificación bacteriana y su estudio de sensibilidad antimicrobiana. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, v.39, n.1, p.19-25, 2005.

JUNG, W. H.; KIM, H. K.; LEE, C. Y.; OH, T. K. Biochemical properties and substrate specificity of lipase from *Staphylococcus aureus* B56. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, n.1, p.25-30, 2002.

KANKI, M.; YODA, T.; TSUKAMOTO, T.; SHIBATA, T. *Klebsiella pneumoniae* Produces No Histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* Strains Are Histamine Producers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.7, p.3462-3466, 2002.

KANWAR, L.; GOSWAMI, P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, n.6, p.727-735, 2002.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; PACK, A.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.2, p.103-125, 1998.

KISKA, D. L.; KERR, A.; JONES, M. C.; CARACCIOLO, J. A.; ESKRIDGE, B.; JORDAN, M.; MILLER, S.; HUGHES, D.; KING, N.; GILLIGAN, P. H. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.4, p.886-891, 1996.

KUMAR, A.; ELLIS, P.; ARABI, Y.; ROBERTS, D.; LIGHT, B.; PARRILLO, J. E.; DODEK, P.; WOOD, G.; KUMAR, A.; SIMON, D.; PETERS, C.; AHSAN, M.; CHATEAU, D. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. **CHEST Journal**, v.136, n.5, p.1237-1248, 2009.

KÜMMERER, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospital in relation to other sources - a review. **Chemosphere**, v.45, n.6, p.957-969, 2001.

KÜMMERER, K.; HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.9, p.1203-1214, 2003.

LAPARA, T. M.; BURCH, T. R.; MCNAMARA, P. J.; TAN, D. T.; YAN, M.; EICHMILLER, J. J. Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior Harbor. **Environmental Science & Technology**, v.45, n.22, p.9543-9549, 2011.

LAZO, M, A; COCA, A, J; DÍAZ, M, M; Y DUSTET, M, J. Biorremediación enzimática de residuales ricos en grasas y aceites. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.61, p.1758-1760, 2005.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR. G. L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, n.2, p.175-180, 2002.

LEE, J. H.; KIM, S. B.; KANG, S. W.; SONG, Y. S.; PARK, C.; HAN, S. O.; KIM, S. W. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus*

oryzae lipases using a supercritical carbon dioxide process. *Bioresource Technology*, v.102, n.2, p.2105-2108, 2011.

LEVINE, M.; EPSTEIN, S. S.; VAUGHN, R. H. Differential reactions in the colon group of bacteria. **American Journal of Public Health**, v.24, n.5, p.505-510, 1934.

LI, D.; YANG, M.; HU, J.; ZHANG, J.; LIU, R.; GU, X.; ZHANG, Y.; WANG, Z. Antibiotic resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. **Environmental Microbiology**, v.11, n.6, p.1506-1517, 2009.

LI, D.; YU, T.; ZHANG, Y.; YANG, M.; LI, Z.; LIU, M.; QI, R. Antibiotic Resistance Characteristics of Environmental Bacteria from an Oxytetracycline Production Wastewater Treatment Plant and the Receiving River. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.11, p.3444-3451, 2010.

LIN, J. F.; LIN, Q.; LI, J.; FEI, Z. A.; LI, X. R.; XU, H.; QIAO, D. R.; CAO, Y. Bacterial diversity of lipase-producing strains in different soils in southwest of China and characteristics of lipase. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, n.16, p.3797-3806, 2012.

LIMA JR, A, F. (2009). **Biodegradação e atividade lipolítica em resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental**. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

LIPSITCH, M.; SAMORET M. Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance: Population Perspective. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.4, p.347-354, 2002.

LIU, T. K.; LIU, Z. K.; CHENG, F. B. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4705-4707, 2003.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.1, p.23-27, 2007.

MARTINY, D.; BUSSON, L.; WYBO, I.; EL HAJ, H.; DEDISTE, A.; VANDENBERG, O. Comparison of the Microflex LT and VITEK MS Systems for Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.4, p.1313-1325, 2012.

MASSONET, C.; VAN ELDERE, J.; VANEECHOUTTE, M.; DE BAERE, T.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K. Comparison of VITEK 2 with ITS2- fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.5, p.2209-2211, 2004.

MELLMANN, A.; CLOUD, J.; MAIER, T.; KECKEVOET, U.; RAMMINGER, I.; IWEN, P.; DUNN, J.; HALL, G.; WILSON, D.; LASALA, P.; KOSTRZEWA, M.;

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; Y FURIGO JR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v.28, n.2, p.296-305, 2005.

MILAN, E. P.; ZAROR, L. Leveduras: identificação laboratorial. In: SIDRIM, J.J.C. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.89-101.

MINAMI, P. S. **Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses**. São Paulo: Manole, 2003, p.23-25, 86-93.

MOHANAN, S.; MARUTHAMUTHU, S.; MUTHUKUMAR, N.; RAJESEKAR, A.; PALANISWAMY, N. Biodegradation of palmarosa oil (green oil) by *Serratia marcescens*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v.4, n.2, p.277-281, 2007.

MONGKOLTHANARUK, W; DHARMISTHITI, S. Biodegradation of lipidich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, n.2, p.101-105, 2002.

NAKASONEA, I.; KINJOA, T.; YAMANEB, N.; KISANUKIA, K.; SHIOHIRAB, C. M. Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and

antimicrobial susceptibility testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.58, n.2, p.191-198, 2007.

NASIM, K.; ELSAYED, S.; PITOUT, J. D.; CONLY, J.; CHURCH, D. L.; GREGSON, D. B. New method for laboratory detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.10, p.4799-4802, 2004.

ODEYEMI, A. T.; ADERIYE, B. I.; BAMIDELE O. S. Lipolytic activity of some strains of *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus* spp. from restaurant wastewater and receiving stream. **Journal of Microbiology Research**, v.3, n.1, p.43-52, 2013.

OGINO, H.; NAKAGAWA, S.; SHINYA, K.; MUTO, T.; FUGIMURA, N.; YASUDA, M.; ISHIKAWA, H. Purification and characterization of organic solvent stable lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, n.5, p.451-457, 2000.

O'HARA, C. M. Manual and Automated Instrumentation for Identification of Enterobacteriaceae and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.1, p.147-162, 2005.

O'HARA, C. M.; SOWERS, E. G.; BOPP, C. A.; DUDA, S. B.; STROCKBINE, N. A. Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family Vibrionaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.12, p.5654-5659, 2003.

O'HARA, C. M.; WESTBROOK, G.; MILLER, M. Evaluation of VITEK GNI+ and Becton Dickinson Microbiology Systems Crystal E/NF Identification Systems for Identification of members of the family Enterobacteriaceae and other gramnegative, glucose-fermenting and non-glucosefermenting bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.12, p.3269-3273, 1997.

OLIVEIRA, V. D. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas nas águas do arroio Dilúvio**. 2011. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Instituto De

Ciências Básicas Da Saúde, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS.

OLIVO, V. A.; LEOS, M. M.; CAMPOS, S. M. Extracción de Grasas y Aceites en los Efluentes de una Industria Automotriz. **Conciencia Tecnológica**, v.40, p.29-34, 2010.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine**, v.119, n.6, p.20-28, 2006.

PEIL, G.; H.; S. **Bioprospecção de microrganismos lipolíticos obtidos de efluentes industriais**. 2015. 54f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PEREIRA, O. L. **Perfil de resistência aos antimicrobianos em coliformes isolados do Sistema Municipal de Abastecimento de Água de São José do Rio Preto-SP**. 2013. 83f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, SP.

PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n.10, p.685-696, 2003.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. **Revista de Nutrição**, v.17, n.3, p.319-326, 2004.

POLONIO, C. J.; POLLI, D. A.; BULLA, C. M.; ROSSETO, P.; DOS SANTOS, M. C.; RHODEN, A. S.; PAMPHILE, A. A.; CONTE, H. Potencial biorremediador de microrganismos: Levantamento de resíduos industriais e urbanos tratáveis no município de Maringá-PR. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.3, n.2, p.31-45, 2014.

PRUDEN, A.; PEI, R.; STORTEBOOM, H.; CARLSON, K. H. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. **Environmental Science & Technology**, v.40, n.23, p.7445-7450, 2006.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinay Microbiology**. 1. ed. Wolfe: Grafos. 1994. 648 p.

REINERT, R. R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, n.3, p.7-11, 2009.

REN, W.; LI, P.; GENG, Y.; LI, X. Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger*. **Journal of Hazardous Materials**, v.167, n.1, 164-169, 2009.

RIVERA, P. C.; GARCÍA, C. F. Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite. **BioTecnología**, v.11, n.2, p.37-45, 2007.

ROBINSON, A.; McCARTER, Y. S.; TETREAULT, J. Comparison of Crystal Enteric/Nonfermenter System, API 20E System, and VITEK Automicrobic system for identification of gram-negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.2, p.364-370, 1995.

ROMEU, B.; SALAZAR, P.; NAVARRO, A.; LUGO, D.; HERNÁNDEZ, U.; ROJAS, N.; ESLAVA, C. Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. **CENIC**, v.41, p.1-9, 2010.

RUIZ, A. A.; GIRALDO, L. F. Tratamiento de aguas residuales de la industria láctea. **Producción + Limpia**, v.2, n.2, p.23-30, 2007.

SANTOS, Q. N. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto – Enfermagem**, v.13, p.64-70, 2004.

SCARASSATI, D.; CARVALHO, R. F.; DELGADO, V. L.; CONEGLIAN, C. M. R.; BRITO, N. N.; TONSO, S.; SOBRINHO, G. D.; PELEGRINI, R. Tratamento de efluentes de matadouros e frigoríficos. In: III FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 2003, Campinas. **Anais do ...** Campinas: UNICAMP, 2003. 9p.

SCHRECKENBERGER, P. C.; RISTOW, K. L.; KRILCICH, A. M. Comparison of the Vitek Legacy, Vitek 2 Colorimetric AND Phoenix Systems for Identification of Fermenting and Non-Fermenting Bacteria of Clinical Origin. As presented at the 105th General Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, DC, USA. American Society for Microbiology, 2005.

SEMIONATO, S. **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura da ETE-UFES**. 2006. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

SÉVENO, N. A.; KALLIFIDAS, D.; SMALLA, K.; ELSAS, J. D.; COLLARD, J. M.; KARAGOUNI, A. Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. **Reviews in Medical Microbiology**, v.13, n.1, p.15-27, 2002.

SHARMA, R.; CHISTIB, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n.8, p.627-662, 2001.

SHINER, E. K.; RUMBAUGH, K. P.; WILLIAMS, S. C. Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acylhomoserinelactones. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, n.5, p.935-947, 2005.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIMMONS, J. S. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. **The Journal of Infectious Diseases**, v.39, n.3, p.209-217, 1926.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Microrganismos e processos biológicos do solo: **Perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA, SPI, p. 142, 1994.

SIQUEIRA Jr, J. F.; ROÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 1-current molecular technologies for microbiological diagnosis. **Journal of Endodontics**, v.31, n.6, p.411-423, 2005.

SONG, B.; LEFF, L. Identification and characterization of bacterial isolates from the Mir space station. **Microbiological Research**, v.160, n.2, p.111-117, 2005.

SOTO, O. B. Fermentation reactions with dried paper discs containing carbohydrate and indicator. **Journal of Public Health**, v.25, n.1, p.96-100, 1949.

STOLL, U.; GUPTA, H. Management strategies for oil and grease residues. **Waste Management & Research**, v.15, n.1, p.23-32, 1997.

STRUTHERS, J. K.; JAYACHANDRAN, K.; MOORMAN, T. B. Biodegradation of atrazine by agrobacterium radiobacter 14a and use of this streain in bioremediation of contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p.3368-3375, 1998.

SUGIMORI, D.; NAKAMURA, M.; MIHARA, Y. Microbial degradation by *Acinetobacter* sp. strain SOD-1. **Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.66, n.7, p.1579-1582, 2002.

VARGAS, L. J.; VILA, A.; LANZA, A.; BONVEHI, P.; NAZAR, J.; MIKIETUK, A.; LABAT, R.; SMAYEVSKY, J. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, v.39, n.1, p.19-25, 2005.

VEIGA, A. A. **Biodegradação de gordura em efluente através da adição controlada de enzimas e microrganismos em reatores aeróbios em série**. 2003. 134f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

WILLEY, R. Fats, oils, and greases: the minimization and treatment of wastewaters generated from oil refining and margarine production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.50, n.2, p.127-133, 2001.

ZAMBRANO, J. L.; BOTERO, L.; CAVAZZA, M. E.; AVILA, M. Resistencia a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aguas residuales crudas y tratadas de lagunas de estabilización con fines de reuso en agricultura. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v.22, n.1, p.44-50, 2002.