

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SIVONEIDE MARIA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Proteus*
mirabilis PROVENIENTES DO RIACHO CAVOUCO, RECIFE-PE**

RECIFE

2017

SIVONEIDE MARIA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Proteus mirabilis* PROVENIENTES DO RIACHO CAVOUCO, RECIFE-PE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Márcia Vanusa da Silva

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Maria Betânia Melo de Oliveira

RECIFE

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Sivoneide Maria da

Caracterização bioquímica e genética de isolados de *Proteus mirabilis* provenientes do Riacho do Cavouco, Recife-PE. / Sivoneide Maria da Silva- 2017.

62 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2017.

Inclui Referências

1. Bactérias gram-negativas 2. Biofilmes 3. Recife (PE) I. Silva, Márcia Vanusa da (orient.) II. Oliveira, Maria Betânia Melo de (coorient.) III. Título

634.9

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-046

SIVONEIDE MARIA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Proteus mirabilis* PROVENIENTES DO RIACHO CAVOUÇO, RECIFE-PE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 17/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor 1: Prof.^a Dr.^a. Márcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Professor 2: Prof.^a Dr.^a. Marcia Maria Camargo de Moraes
Universidade de Pernambuco – UPE

Professor 3: Prof.^a Dr.^a. Ana Catarina de Souza Lopes
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico a minha família:

Meus pais Sebastião e Maria Aparecida, minha
irmã Maricleide e meu sobrinho Álisson.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo milagre da minha vida e cuidar zelosamente de cada um de meus passos.

Ao meu pai Sebastião, pelas orações silenciosas na calmaria da noite intercedendo pelo meu futuro e, de modo especial, por ser a fonte de minha inspiração.

À minha amada mãe Maria Aparecida, por acreditar em mim mais do que eu mesma e pelo colo único que me fortalece.

À minha irmã Maricleide, por sonhar comigo os meus sonhos e apoiar as minhas decisões.

Aos meus tios e tias, que torcem pelo sucesso profissional, principalmente minha tia Edmilsa, que me incentiva a seguir em frente.

À minha avó Minervina, que mesmo sem entender meus estudos, intercede a Deus pelos meus planos de vida.

À minha prima Fernanda, pelo apoio, companheirismo, compreensão e por torcer para que tudo dê certo.

A todos meus familiares pelo carinho, especialmente, minha priminha Juliana e meu sobrinho Álisson, que enchem minha vida de alegria.

Aos meus amigos novos e velhos, pelas palavras de incentivo que me fazem acreditar que no final tudo dá certo.

De modo, particular, aos companheiros de laboratório: Amanda, Lívia, Tayane, Bárbara, Vitória, Camilla, Cecília, Hortência, Júnior, Bruno, Jan, Priscilla, Clóvis, San Mires, Cícero, Izabelly e todos os outros que acompanharam minha trajetória e me ajudaram a realizar este sonho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, que estão sempre predispostos a nos auxiliar.

Às professoras Márcia e Betânia pela orientação, profissionalismo, confiança e palavras de encorajamento, que estão marcadas na minha memória e foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Pós-Graduação pelos serviços prestados e aos professores do Programa por auxiliar no aprimoramento dos nossos conhecimentos acadêmicos.

Por fim, agradeço a UFPE e ao Departamento de Bioquímica pelo espaço cedido e aos órgãos de fomento, especialmente a CAPES, pelo apoio financeiro.

“Imagine uma nova história para sua vida
E acredite nela.”
(Paulo Coelho)

RESUMO

A presença de bactérias resistentes no ambiente aquático provenientes dos seres humanos e animais expostos a antimicrobianos é um dos principais problemas desse ecossistema. O riacho Cavouco é um afluente do rio Capibaribe, principal rio de Pernambuco. Esse riacho, durante seu percurso, recebe um aporte de carga poluidora de resíduos. Diferentes espécies bacterianas foram identificadas nesse ambiente, como *Proteus mirabilis*, que ocorre na água, no solo, no trato gastrointestinal humano e de outros animais. O presente estudo objetivou caracterizar genética e bioquimicamente os isolados de *P. mirabilis* obtidos do riacho Cavouco, em comparação com isolados clínicos de mesma espécie. A cepa 767 (UFPEA) foi utilizada como controle de referência. A identidade dos isolados foi confirmada pela técnica MALDI-TOF-MS, que se mostrou eficiente com alto grau de compatibilidade com a espécie *P. mirabilis*. O perfil de susceptibilidade foi realizado em triplicata por meio do antibiograma, o perfil de hidrofobicidade pelo método de aderência a hidrocarboneto, a formação de biofilme em diferentes meios (LB, BHI e TSB) pelo método do cristal violeta e MEV, além da erradicação do biofilme pelos antimicrobianos utilizados no antibiograma. A diversidade genética dos isolados foi analisada por ERIC-PCR. Dois isolados clínicos (ICP4, ICP5) se mostraram multirresistentes, enquanto que os isolados ambientais apresentaram resistência apenas a tetraciclina, exceto o isolado CP₅25S que se mostrou resistente também a ampicilina. Todos os isolados apresentaram capacidade para a formação de biofilme nos meios testados. Porém, todos os antimicrobianos foram capazes de erradicar o biofilme formado em mais de 50% dos isolados ambientais e, parte desses agentes, erradicou o biofilme dos isolados clínicos ($\geq 50\%$). Não foi possível observar formação de biofilme por MEV utilizando lamínulas de vidro. Quanto ao perfil de hidrofobicidade, três isolados ambientais se mostram moderadamente hidrofóbicos e os demais hidrofílicos. Pela técnica ERIC-PCR não foi possível diferenciar os isolados clínicos dos ambientais nem entre os isolados de um mesmo grupo. A resistência a tetraciclina pelos isolados, deve-se a mecanismos intrínsecos de resistência conforme dados da literatura. Já a multirresistência por isolados clínicos pode ser adquirida, uma vez que o ambiente hospitalar abriga diversos genes de resistência. Por outro lado, a expressiva formação de biofilme, sobretudo pelos isolados ambientais, indica um mecanismo de proteção em resposta ao ambiente impactado no qual vivem, independe da significativa erradicação de biofilme, pois esses isolados podem não estar sob pressão seletiva direta a estes antimicrobianos. Neste estudo, os isolados se mostraram majoritariamente hidrofílicos com baixa capacidade de aderência em lamínulas de vidro, possivelmente, devido a forças repulsivas. Os diferentes perfis de resistência encontrados não garante a presença de clones bacterianos distintos entre os isolados investigados, uma vez que foi observado clonalidade entre os clínicos e ambientais. Entretanto, a presença de bactérias potencialmente produtoras de biofilme no riacho Cavouco é preocupante para a saúde pública.

Palavras-chave: Ambiente aquático. Biofilme. Resistência bacteriana.

ABSTRACT

The presence of resistant bacteria in the aquatic environment from humans and animals exposed to antimicrobials is one of the main problems of this ecosystem. The Cavouco stream is a tributary of the Capibaribe river, the main river of Pernambuco. This stream, during its course, receives a contribution of pollutant load of residues. Different bacterial species have been identified in this environment, such as *Proteus mirabilis*, which occurs in water, soil, human gastrointestinal tract and other animals. The present study aimed to characterize the genetically and biochemically isolates of *P. mirabilis* obtained from the Cavouco stream, in comparison to clinical isolates of the same species. Strain 767 (UFPEDA) was used as reference control. The identity of the isolates was confirmed by the MALDI-TOF-MS technique, which proved to be efficient with a high degree of compatibility with the *P. mirabilis* species. The susceptibility profile was performed in triplicate by means of the antibiogram, hydrophobicity profile by the hydrocarbon adherence method, biofilm formation in different media (LB, BHI and TSB) by the crystal violet method and SEM, besides the eradication of the biofilm by antimicrobials used in the antibiogram. The genetic diversity of the isolates was analyzed by ERIC-PCR. Two clinical isolates (ICP4, ICP5) were multiresistant, whereas the environmental isolates showed resistance only to tetracycline, except the CP525S isolate, which was also resistant to ampicillin. All the isolates had the capacity to biofilm in the media tested. However, all the antimicrobials were able to eradicate the biofilm formed in more than 50% of the environmental isolates and, part of these agents, eradicated the biofilm of the clinical isolates ($\geq 50\%$). It was not possible to observe biofilm formation by MEV using glass coverslips. As for the hydrophobicity profile, three environmental isolates are moderately hydrophobic and the other hydrophilic ones. By the ERIC-PCR technique it was not possible to differentiate the isolates to differentiate the clinical isolates from the environmental isolates or from the same group. The resistance to tetracycline by the isolates is due to intrinsic mechanisms of resistance as reported in the literature. However, multiresistance by clinical isolates can be acquired, since the hospital environment hosts several resistance genes. On the other hand, the expressive biofilm formation, especially by environmental isolates, indicates a protective mechanism in response to the impacted environment in which they live, independent of the significant biofilm eradication, since these isolates may not be under direct selective pressure to these antimicrobials. In this study, the isolates showed to be mostly hydrophilic with low adhesion capacity in glass coverslips, possibly due to repulsive forces. The different resistance profiles found did not guarantee the presence of distinct bacterial clones among the investigated isolates, since clinical and environmental clonality was observed. However, the presence of potentially biofilm-producing bacteria in the Cavouco stream is a concern for public health.

Keywords: Aquatic environment. Biofilms. Bacterial resistance.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Mecanismos de transferência horizontal de genes.....	19
Figura 2: Representação do riacho Cavouco no trecho dentro dos limites do <i>Campus</i> e os pontos de coleta dos micro-organismos.....	21
Figura 3: Representação esquemática das etapas de análise por MALDI-TOF-MS.....	23
Figura 4: Morfologia celular de <i>Proteus mirabilis</i>	25
Figura 5: Esquema da classificação dos mecanismos de ação dos antibióticos.....	27
Figura 6: Mecanismos de resistência aos betalactâmicos em enterobactérias.....	30
Figura 7: Principais vias de transmissão de genes de resistência aos antimicrobianos.....	31
Figura 8: Representação das etapas da adesão e formação de biofilme bacteriano.....	32

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1: Identificação dos isolados bacterianos por aquisição de espectros de massa 43

Tabela 2: Caracterização bioquímica dos isolados de *P. mirabilis* estudados 44

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1: Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de isolados clínicos e ambientais de <i>P. mirabilis</i>	45
Figura 2: Formação de biofilme em diferentes meios de crescimento.....	45
Figura 3: Visualização de isolados de <i>P. mirabilis</i> por MEV	46
Figura 4: Diversidade genética dos isolados de através da técnica de ERIC-PCR.....	47

LISTA DE ABREVIACÕES

ACU – Adesina Celular Uroepitelial

AMI - Amicacina

AMP - Ampicilina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI - Brain Heart Infusion

CFL - Cefalotina

CFZ - Cefazolina

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CPM - Cefepima

CIP - Ciprofloxacina

CF - Citometria de Fluxo

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade Óptica

ERIC - Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

GEN - Gentamicina

HSC - Hidrofobicidade da Superfície Celular

LB - Luria Bertani

MALDI-TOF-MS - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight - Mass Spectrometry

MER – Meropenem

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MEVA - Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental

MLST - Multilocus sequence typing

NuBIOMA - Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Polymerase Chain Reaction

PGRQ - Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos

PFGE - Pulse-Field Gel Electrophoresis

RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA

TET - Tetraciclina

TGH - Transferência Horizontal de Gene

TRI – Trimetoprim

TSB - Tryptose Soy Broth

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

UFPEDA - Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Antibióticos

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 MICRO-ORGANISMOS RESISTENTES EM AMBIENTES AQUÁTICOS IMPACTADOS	18
3.2 RIACHO CAVOUCO	20
3.3 IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA POR MALDI-TOF-MS.....	22
3.4 <i>Proteus mirabilis</i>	24
3.5 ANTIMICROBIANOS.....	26
3.6 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	28
3.7 FORMAÇÃO DE BIOFILME	32
3.8 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	34
4 ANEXO 1.....	36
5 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A maior parte da produção de efluentes domésticos e industriais é descartada inadequadamente em ecossistemas aquáticos de água doce, limitando a disponibilidade dos recursos hídricos já escassos e comprometendo as relações entre os seres vivos. Como a decomposição de substâncias orgânicas por micro-organismos é um processo ecológico natural, a quantidade de detritos urbanos em corpos hídricos atrai uma quantidade significativa de agentes decompositores, reduzindo o oxigênio presente na água e causando desequilíbrio nas comunidades naturais (BATISTA et al., 2016).

Outro problema que atinge o ambiente aquático é a contaminação por bactérias resistentes provenientes dos seres humanos e animais expostos a antimicrobianos (OSINSKA; HARNISZ; KORZENIEWSKA, 2016; POMA; MAMANI; IÑIGUEZ, 2016). Dentre os diferentes nichos ecológicos, o ambiente aquático é considerado eficiente para a seleção de populações bacterianas resistentes a esses antimicrobianos, através da transferência de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons. A aquisição de um perfil genético aprimorado aumenta a adaptabilidade e perpetuação dessas espécies, levando ao surgimento de cepas multirresistentes (NAZARET; AMINOV, 2014; VON WINTERSDORFF et al., 2016).

O riacho Cavouco é um afluente da bacia hidrográfica do Capibaribe, um dos principais rios do estado de Pernambuco e possui sua nascente no *Campus* Recife da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). No trecho que percorre dentro do *Campus*, esse riacho recebe um aporte de carga poluidora de resíduos provenientes dos laboratórios de ensino e pesquisa e resíduo hospitalar, além de despejo doméstico oriundos da população circunvizinha. O efeito cumulativo desses resíduos descartados inadequadamente vem provocando mudanças na dinâmica desse ecossistema, afetando a qualidade da água, a micro e macrofauna e flora existentes (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2013; FREITAS et al., 2016).

Diferentes ações vêm sendo realizadas pelo grupo de pesquisa Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente (NuBIOMA) da UFPE em parceria com a Superintendência de Infraestrutura (antiga prefeitura universitária) na tentativa de resgatar a qualidade da água e vida desse riacho. Dentre essas ações, destaca-se a caracterização fenotípica e molecular da microbiota do Cavouco, que até o presente momento identificou diferentes táxons bacterianos pertencentes a isolados Gram-positivos e Gram-negativos. Um dos táxons corresponde ao gênero *Proteus*, atualmente representado por quatro espécies: *Proteus mirabilis*, *Proteus*

vulgaris, *Proteus penneri*, *Proteus hauseri* e três genomoespécies (4, 5 e 6) que ainda não foram nominadas (DRZEWIECKA, 2016). Normalmente, esses micro-organismos vivem em ambientes naturais, mas podem ser encontrados no trato gastrointestinal humano e de outros animais. Essas espécies, tanto de origem comunitária quanto hospitalar, podem apresentar diferentes infecções decorrentes de alimentos e ambientes contaminados, além de profissionais de saúde que podem ser veículos de transmissão (PARK et al., 2012).

No riacho Cavouco, foram identificados apenas isolados da espécie *P. mirabilis*. Apesar da importância da caracterização fenotípica e molecular desse micro-organismo, a sua identificação não é suficiente para entender a dinâmica de sobrevivência no ambiente. Uma vez que a frequência e a diversidade populacional são aspectos diretamente relacionados aos fatores ambientais (BAQUERO et al., 2015), o presente estudo objetivou caracterizar o perfil de resistência, a capacidade de formação de biofilme, bem como a diversidade genética de isolados de *P. mirabilis* obtidos do riacho Cavouco e de isolados clínicos, a fim de realizar uma análise comparativa entre eles e avaliar a exposição de bactérias aos agentes poluidores no ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar as características bioquímicas e genéticas de isolados de *P. mirabilis* provenientes do riacho Cavouco-UFPE, em comparação com isolados clínicos da mesma espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os isolados bacterianos por aquisição de espectros de massa;
- Caracterizar os isolados de *P. mirabilis* quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos;
- Avaliar o perfil de hidrofobicidade da superfície celular das amostras;
- Quantificar a formação e a erradicação de biofilme pelos isolados bacterianos;
- Analisar a diversidade genética entre os isolados estudados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICRO-ORGANISMOS RESISTENTES EM AMBIENTES AQUÁTICOS IMPACTADOS

A água, como um recurso essencial para a manutenção da vida, deve ser ingerida em quantidades significativas diariamente. Porém, quando essa substância não corresponde aos níveis adequados para o consumo humano, pode representar um meio de transmissão de doenças. Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (2016), aproximadamente metade da população mundial em desenvolvimento será acometida por infecções diretamente relacionadas com água fora dos padrões de qualidade e/ou com falta de saneamento adequado ou mesmo inexistente.

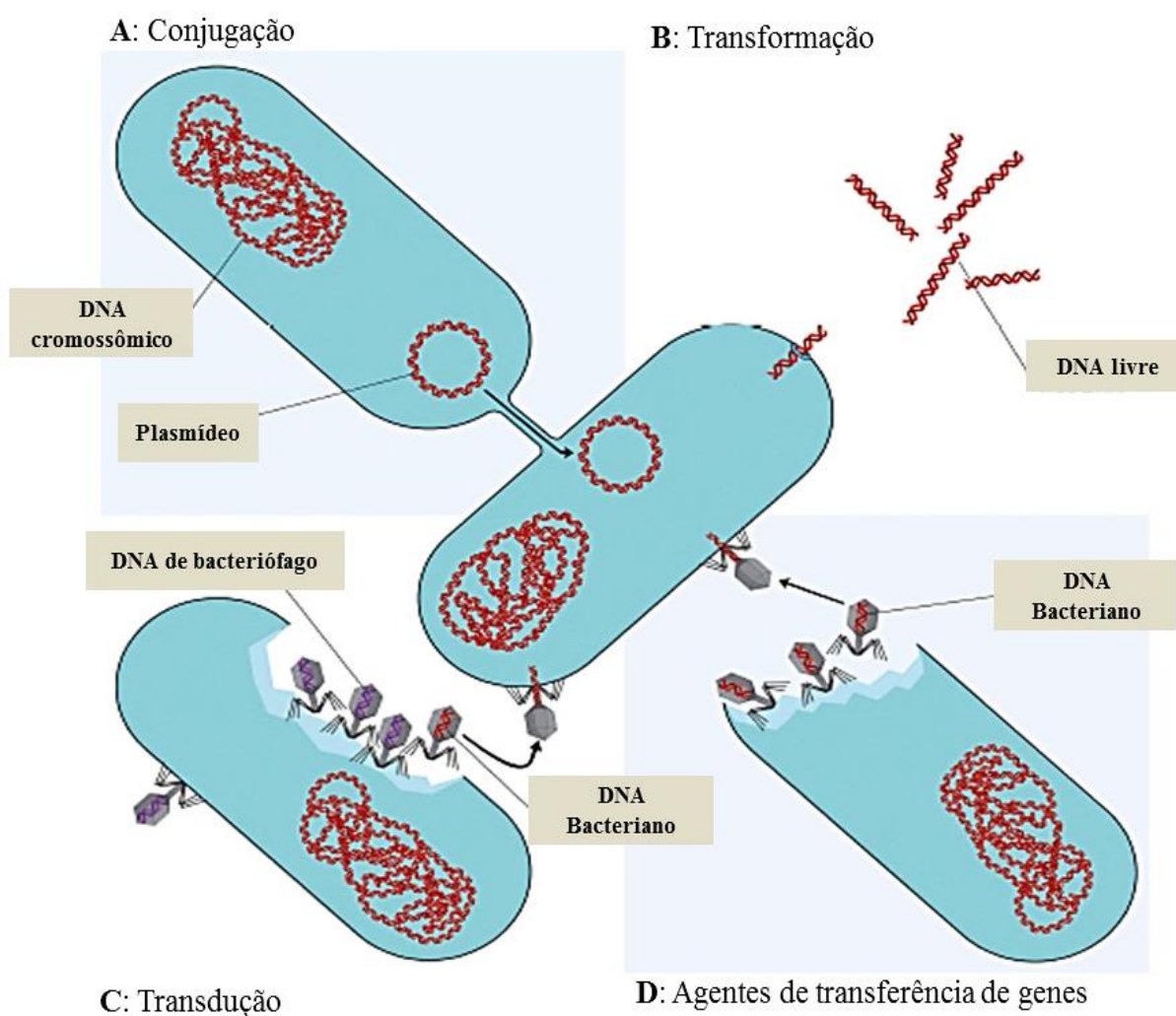
Em estudos de análise da qualidade microbiológica da água, a identificação de diferentes perfis de coliformes termotolerantes, que podem ser indicadores de poluição fecal, demonstra que a contaminação de fontes hídricas por dejetos humanos e de outros animais endotérmicos representa um potencial risco para a saúde pública (GIOWANELLA et al., 2015; CAHOON et al., 2016; TEMPLAR et al., 2016; BRADSHAW et al., 2016). A presença constante de bactérias patogênicas em ambientes aquáticos urbanos configura uma das principais causas de doenças intestinais como, por exemplo, a gastroenterite sazonal (GARDEA et al., 2016).

Como os micro-organismos são desprovidos de defesas físicas, comumente, bactérias precisam desenvolver estratégias adaptativas contínuas em ambientes considerados desfavoráveis para sua sobrevivência e propagação de novas populações. Dentre as características que favorecem a distribuição global desses seres vivos, destaca-se a grande capacidade de transferência horizontal de genes (THG), que possibilita a recombinação de caracteres positivos, bem como permite adaptação de procariotos a um nicho ecológico específico por um longo período de tempo (BAQUERO; TEDIM; COQUE, 2013; CROUCHER et al., 2016).

O descarte inadequado de dejetos residenciais e hospitalares e efluentes industriais causam desequilíbrio nos ecossistemas aquáticos naturais, consequentemente, contribuem para ocorrência de cepas bacterianas multirresistentes a antimicrobianos que são utilizados rotineiramente nos tratamentos clínicos. Embora venham sendo investigados os tipos de agentes poluidores destes ambientes, bactérias portadoras de genes de resistência ainda recebem pouca atenção em comparação a outros contaminantes (DODD, 2012).

Os antimicrobianos são a principal fonte de mudanças em microambientes naturais e influenciam uma diversidade de processos incluindo o aumento de THG como a conjugação, transdução e recombinação (Figura 1) (BAQUERO et al., 2015; VON WINTERSDORFF et al., 2016). O crescimento da resistência aos antimicrobianos é frequentemente associado à alta capacidade adaptativa de micro-organismos, sendo as bactérias mais susceptíveis às mudanças e aquisição de genes. Neste contexto, o monitoramento constante de comunidades bacterianas é uma ferramenta que pode levar a compreensão da complexidade deste fenômeno e do impacto das atividades humanas sobre os ambientes naturais (JUTKINA et al., 2016).

Figura 1: Mecanismos de transferência horizontal de genes.



(A) A conjugação é um processo no qual o DNA é transferido da célula doadora para a célula receptora via pili da superfície celular. (B) A transformação é a absorção, integração e expressão funcional de fragmentos nus de DNA extracelular. (C) Na transdução, bacteriófagos podem transferir DNA bacteriano de uma célula doadora previamente infectada para uma célula receptora. (D) Agentes de transferência de genes são partículas do tipo bacteriófago que carregam pedaços aleatórios do genoma da célula produtora. Fonte: Adaptado de Von Wintersdorff et al., 2016.

As diversas alterações no meio ambiente ao longo dos anos, derivadas da ação antrópica, podem influenciar direta ou indiretamente a variabilidade genética e as rotas metabólicas dos micro-organismos para que estes possam tolerar e se adaptar às condições do meio em que vivem (VARELA et al., 2014). A expressão e/ou combinação de novas características pode resultar no aparecimento de novas linhagens evolutivas. Desse modo, as variações ambientais e temporais impulsionam para a aquisição de novos genes, levando ao surgimento de cepas bacterianas multirresistentes portadoras de variados fatores de virulência (BAQUERO et al, 2015; VON WINTERSDORFF et al., 2016).

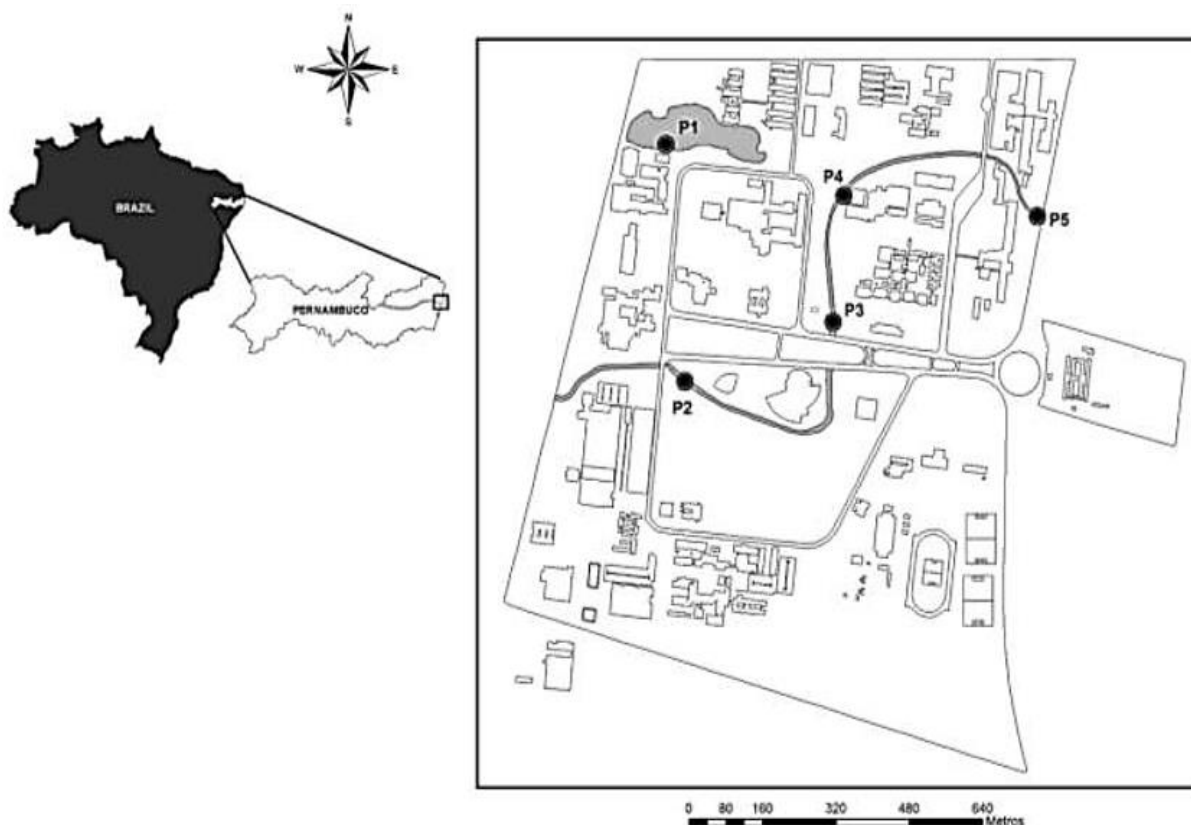
3.2 RIACHO CAVOUCO

O riacho Cavouco é um afluente da margem direita da bacia hidrográfica do rio Capibaribe, fonte de recursos hídricos para a maioria das indústrias e áreas de irrigação de alimentos no estado de Pernambuco. Esse riacho possui sua nascente na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) no *Campus* Recife. Desde 1998, a nascente do Cavouco foi transformada em um lago com as margens delimitadas e com adição de água nos períodos de seca na região (ESPINDULA; SANTOS, 2004).

No trecho em que percorre dentro dos limites da Universidade, esse riacho recebe uma contribuição significativa de resíduos poluidores provenientes dos laboratórios de ensino e pesquisa, além de resíduos hospitalares e efluentes domésticos derivados da população adjacente (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2013; FREITAS et al., 2016). Consequentemente, o lançamento inadequado desses resíduos pode causar desequilíbrios ecológicos nesse ambiente, alterar de forma expressiva a qualidade da água e contribuir para a ocorrência e disseminação de bactérias resistentes no meio ambiente (Figura 2).

A Resolução de nº 467 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2015) recomenda critérios para utilização de produtos químicos ou biológicos em fontes hídricas, visando o controle de espécies que causem impacto negativo ao meio ambiente, à saúde pública, entre outros. Cientes dessas recomendações, o grupo de pesquisa NuBIOMA (Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente), em parceria com a Superintendência de Infraestrutura da UFPE vem desenvolvendo diferentes projetos de pesquisa e extensão visando contribuir com a implementação de um plano de gerenciamento de resíduos ambientais. Indiretamente, essa iniciativa também reforça as diversas reivindicações ao Governo Estadual para realização de um plano maior de sustentabilidade hídrica que beneficie todo o percurso do rio Capibaribe.

Figura 2: Representação do riacho Cavouco no trecho dentro dos limites do *Campus* e os pontos de coleta dos micro-organismos.



Fonte: Purificação-Júnior et al., 2017.

Um plano de gestão de resíduos químicos nos principais laboratórios do Departamento de Farmácia da UFPE já foi proposto, sugerindo ajustes na estrutura física, procedimentos internos, gestão de substâncias e atividades educativas. A identificação dos principais resíduos químicos gerados pelos laboratórios e o fornecimento de informações teóricas e práticas visaram o cumprimento das normas de biossegurança. No entanto, a implementação de um Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos (PGRQ) ainda inexistente na instituição, deverá ser uma ação conjunta visando melhorias para comunidade acadêmica e para o meio ambiente (BEZERRA-FILHO; FRANCA; OLIVEIRA, 2014).

Paralelamente, Assis e seus colaboradores (2014) investigaram alterações enzimáticas em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* coletados no Cavouco. A pesquisa revelou que todas as atividades enzimáticas avaliadas se mostraram afetadas nessa espécie, devido às condições ambientais de seu *habitat*, quando comparadas a uma população controle. Desse modo, esse riacho apresenta indícios de contaminação a nível bioquímico, sendo necessário o monitoramento e maiores investigações sobre seus agentes poluidores.

Um estudo recente realizado por Freitas et al. (2016) objetivou apresentar uma alternativa de tratamento para o riacho Cavouco. Neste trabalho, os autores avaliaram o

potencial de sulfato de alumínio, utilizado como coagulante nos tratamentos de água, e de uma lectina (WSMoL), extraída de *Moringa oleifera*, capaz de reduzir a concentração dos íons metálicos em solução aquosa. O estudo mostrou que a combinação de sulfato de alumínio e da lectina foi satisfatório na redução da turbidez e da ecotoxicidade de uma amostra de água poluída desse riacho.

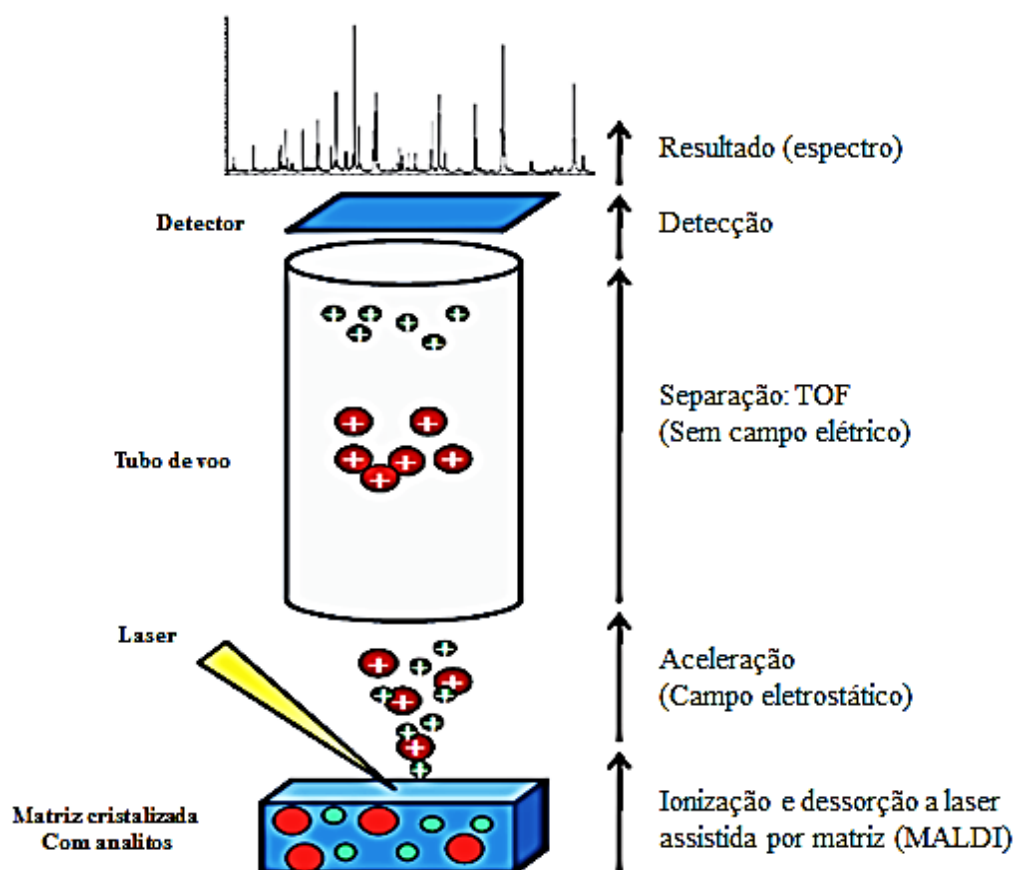
Dentre as diferentes linhas de pesquisa do grupo NuBIOMA, destaca-se a caracterização fenotípica e molecular da microbiota do Cavouco. Esse projeto vem identificando diferentes espécies bacterianas, tais como: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (PURIFICAÇÃO-JÚNIOR et al., 2017), que podem ser indicadores de poluição fecal em ecossistemas aquáticos impactados. Mecanismos de resistência dos isolados de *E. coli* foram investigados, e diferentes perfis de resistência a antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilme foram observados (ARAÚJO et al., 2016). Recentemente, Almeida et al. (2017) investigaram isolados Gram-positivos do gênero *Bacillus* obtidos desse riacho e sugeriram que a formação de biofilme contribui para a sobrevivência em ambientes impactados. Com isso, a presença de enterobactérias neste ambiente é preocupante para a saúde pública, uma vez que esse riacho deságua no rio Capibaribe.

3.3 IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA POR MALDI-TOF-MS

A identificação de bactérias, normalmente, é realizada por testes fenótipos através das diferenças metabólicas entre as espécies. Apesar de ser um método clássico e considerado confiável, apresenta a desvantagem do tempo de crescimento que pode se estender de 24 até 48 horas. Diante do quadro da resistência bacteriana e do risco de bacteremia hospitalar, novas metodologias de identificação de bactérias como a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz / tempo de voo (MALDI-TOF-MS), se mostram satisfatórias (PASTERNAK, 2012; MAILHAC et al., 2017).

A técnica apresenta um modo de ionização a laser brando no qual as moléculas ionizadas são observadas com pouca ou nenhuma fragmentação. Após a cristalização do material na matriz, as moléculas são aceleradas através de um campo eletrostático, lançadas em um tubo de voo até o alcance do detector (Figura 3). As características das impressões digitais em forma de espectros de massa com intensidades variáveis são únicas para cada micro-organismo, sendo consideradas ideais para a identificação microbiana ao nível de gênero e de espécie (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

Figura 3: Representação esquemática das etapas de análise por MALDI-TOF-MS.



Fonte: Adaptado de Croxatto; Prod'hom; Greub (2012).

Em microbiologia, a técnica de MALDI-TOF-MS é utilizada para identificar uma diversidade de micro-organismos incluindo bactérias, fungos e vírus. Devido à capacidade para caracterizar micro-organismos, essa técnica tem sido aplicada em várias áreas incluindo diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental e controle da qualidade de alimentos. Além disso, os materiais utilizados em experimentos por esse método são de baixo custo financeiro (SANTOS et al., 2013; NOWAKIEWICZ et al, 2017).

O processo de identificação por meio dessa tecnologia baseia-se na análise de impressões digitais de proteínas ribossômicas, bem como de proteínas básicas. Como a massa proteica é representada por aproximadamente 20% de proteínas ribossômicas, que representam 3% da massa celular total, o MALDI-TOF-MS pode ser um método rápido para identificar uma grande variedade de isolados, independentemente do micro-organismo (AVANZI et al., 2016).

A identificação rápida e precisa de agentes patogênicos, do ponto de vista clínico, é essencial para os tratamentos antimicrobianos adequados. Além de ser comparada com a caracterização fenotípica quanto ao baixo custo, essa tecnologia também se apresenta tão precisa quanto a sequenciação do gene *16S rDNA* (WATTAL et al., 2016). O MALDI-TOF-

MS compara por meio de softwares específicos os resultados obtidos com os espectros de referência armazenados em bancos de dados. Apesar de, inicialmente, ter sido desenvolvido para a identificação de micro-organismos de importância clínica, novas informações podem ser acrescentadas na base de dados (AVANZI et al., 2016). Desse modo, essa tecnologia vem sendo integrada ao cotidiano de profissionais em laboratórios, bem como complementando as técnicas bioquímicas e/ou moleculares tradicionais (SAUGET et al., 2016).

3.4 *Proteus mirabilis*

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem sido cada vez mais estudada devido aos altos índices de ocorrência e prevalência de cepas multirresistentes no ambiente hospitalar. Como um agente infeccioso humano, *P. mirabilis* é uma bactéria oportunista mais conhecida por sua capacidade de causar infecções do trato urinário. Estas infecções ocorrem principalmente em pacientes submetidos a longos períodos de cateterismo, bem como imunocomprometidos (MELO et al., 2016).

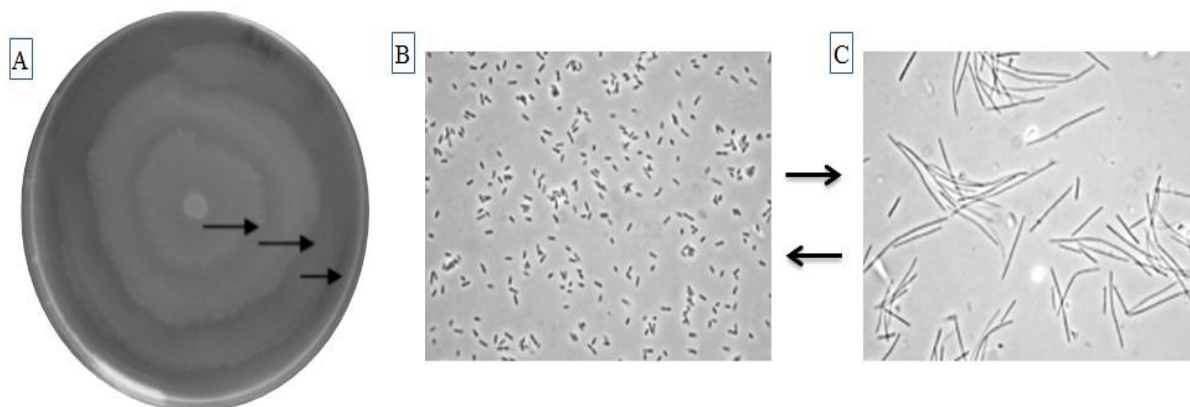
Em laboratórios clínicos e de pesquisa, esse micro-organismo é conhecido especialmente por sua capacidade de produzir a enzima urease e pela elevada capacidade de motilidade. *P. mirabilis* é identificado como um bacilo Gram-negativo móvel, urease positiva e lactose negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae. Um conjunto diversificado de fatores de virulência é utilizado por cepas dessa espécie para colonizar o trato urinário de pacientes debilitados incluindo urease, proteases, toxinas, aquisição de ferro e zinco, enxameação, fímbrias e formação de biofilme (DRZEWIECKA, 2016; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

Cepas de *P. mirabilis*, quando cultivadas em meio sólido, apresentam um sublime mecanismo de motilidade denominado enxameação (swarming), no qual formas celulares vegetativas, típicas de enterobactérias, se diferenciam em células enxame alongadas e retornam a forma inicial em um processo cíclico e complexo de diferenciação celular (Figura 4). As descobertas científicas sobre as alterações morfológicas dessa bactéria são fundamentais para compreender a sua patogenia (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012).

Diferentes linhas de pesquisas procuram esclarecer os mecanismos de regulação e interação necessários para a diferenciação celular em *P. mirabilis* como, por exemplo, a regulação da expressão gênica comandada por genes específicos (MORGENSTEIN; SZOSTEK; RATHER, 2010). Possivelmente, devido à densidade celular durante a enxameação, este complexo mecanismo de movimento também pode ser controlado pelo sistema de *quorum sensing*, como já foi observado em outros gêneros bacterianos

(STANKOWSKA et al. 2012; NICKZAD; LÉPINE; DÉZIEL, 2015). Além disso, foi constatado que aminoácidos como a L-glutamina, quando adicionados em meios de cultivo normalmente não apropriados, contribuíram com o início da enxameação de isolados de *P. mirabilis* em resposta específica a nutrientes e a estímulos ambientais (ARMBRUSTER, HODGES; MOBLEY, 2013).

Figura 4: Morfologia celular de *Proteus mirabilis*.



(A) Enxameação de *P. mirabilis* em placa de ágar, as setas indicam ciclos diferentes de diferenciação celular. (B) Morfologia de células vegetativas. (C) Células exame alongadas. Fonte: Adaptado de Morgenstein; Szostek; Rather (2010).

Um estudo referente às alterações morfológicas nas células de *P. mirabilis* realizado por Tuson et al. (2013), demonstrou uma relação entre a densidade do flagelo e a mobilidade das células em ambientes viscosos, na qual o aumento da densidade do flagelo produziu um aumento na velocidade celular. De acordo com os autores, ainda não está completamente elucidado como essas alterações morfológicas apresentadas por estas bactérias podem conferir vantagens adaptativas às mudanças ambientais. Entretanto, são valiosas para o tratamento de infecções urinárias, pois podem auxiliar no controle do movimento desses patógenos em superfícies de cateteres.

A prevalência e o aumento de infecções polimicrobianas envolvendo *P. mirabilis* foi investigado por Armbruster et al. (2014). Os autores mencionam que existem muitas maneiras nas quais essa bactéria pode interagir com outros agentes patogênicos e demonstram em seu estudo que infecção com *P. mirabilis* em associação com *Providencia stuartii* aumenta a incidência de bacteremia e urolitíase. Destacam, claramente, a importância da urease nas complicações dessas patologias, ao indicarem um mecanismo sinérgico de indução da atividade da enzima durante a coinfeção de ratos infectados com duas espécies produtoras de urease.

A presença de genes que conferem resistência a antimicrobianos de diferentes classes e mecanismos de ação em isolados clínicos de *P. mirabilis*, vem sendo descrita em muitos países (HU et al., 2012; MICHALSKA et al., 2014; BEDENIC et al., 2016), inclusive no Brasil (CABRAL et al., 2015). Além da disseminação de bactérias resistentes nos hospitais, também tem sido relatada a ocorrência de isolados bacterianos com resistência a antimicrobianos provenientes de fontes hídricas (POONIA; SINGH; TSERING, 2014). Em uma cidade de Bangladesh, por exemplo, foram identificados isolados de *P. mirabilis* resistentes a cefalosporinas em pontos de abastecimento urbano de água, indicam a exposição anterior desses micro-organismos a betalactâmicos e a água da torneira como um possível meio de transmissão de doenças (CHOUDURI; WADUD, 2013).

Na Índia, foram identificadas bactérias patogênicas como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, entre outras, na pele, brânquias e intestino de todos os peixes coletados em uma lagoa. Todas as espécies bacterianas identificadas em amostras de água desse ambiente estavam presentes nos peixes. Assim, o consumo de peixes coletados em águas contaminadas por diferentes bactérias de importância clínica, pode ser um meio de contaminação humana (SARASWATHI; SUMITHRA; SIVAKAMI, 2015).

No Brasil, mais recentemente, Nascimento, Maia e Araújo (2016) investigaram a contaminação da água de reservatórios do semiárido do país. Entre as enterobactérias identificadas no estudo, as espécies *E. coli*, *E. cloacae* e *K. pneumoniae* foram as mais recorrentes. Embora com menor frequência, *P. mirabilis* e outras espécies também estavam presentes em alguns pontos de coleta. O trabalho evidenciou a contaminação de ambientes aquáticos por bactérias consideradas patogênicas para o homem, bem como a contaminação constante dos reservatórios por matéria orgânica de origem fecal. Com isso, observa-se que os riscos de se contrair uma infecção bacteriana e a resistência aos antimicrobianos não estão limitados ao espaço hospitalar.

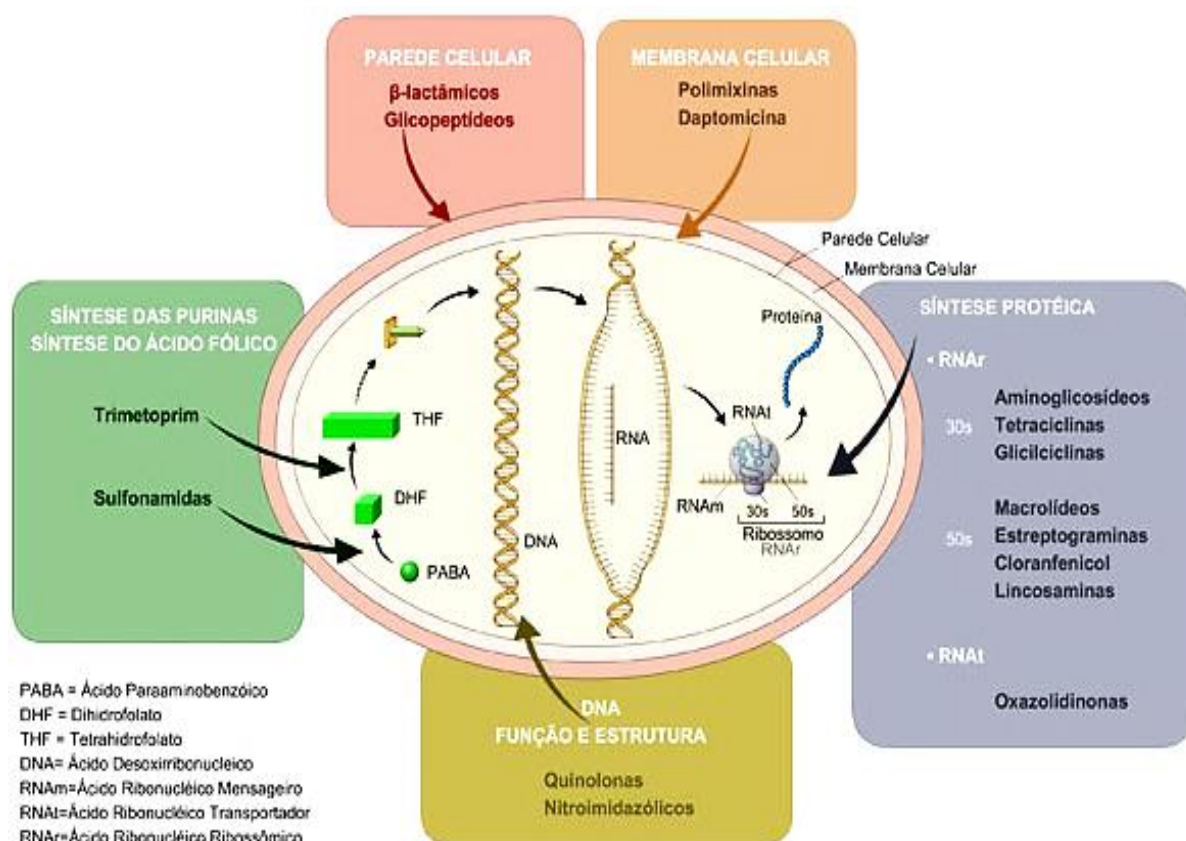
3.5 ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos podem ser tanto composições químicas oriundas de fontes naturais quanto formulações de origens sintéticas capazes de inibir o crescimento do micro-organismo invasor (bacteriostáticos), bem como promover a sua destruição (bactericidas) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Os antimicrobianos mais apropriados para o tratamento de infecções, por quaisquer agentes infecciosos, são aqueles que exercem seus respectivos mecanismos de ação diretamente sobre o patógeno sem causar danos ao

hospedeiro, ou seja, apresentam toxicidade seletiva. No entanto, todos os antimicrobianos podem apresentar efeitos colaterais (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

Normalmente, os antibióticos são classificados de acordo com seus respectivos espectros e mecanismos de ação. Mediante a descrição e síntese de novos compostos foi necessário organizá-los nos seguintes grupos: inibidores da síntese da parede celular; inibidores da síntese da membrana citoplasmática; inibidores da síntese proteica nos ribossomos; alteração da síntese dos ácidos nucleicos e alteração do metabolismo celular (Figura 5).

Figura 5: Esquema da classificação dos mecanismos de ação dos antibióticos.



Fonte: ANVISA. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/pop_mecanismo.htm>. Acesso em 17/01/2017.

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2013), o tratamento para infecções causadas por enterobactérias multirresistentes se baseia na associação de dois ou mais antimicrobianos, visando aumentar seus efeitos e evitar o risco de infecções polimicrobianas nosocomiais graves, o que pode ocorrer com a utilização de monoterapias. Entretanto, para a combinação apropriada é necessário o conhecimento da potencialidade de sinergismo entre os antibióticos.

A prescrição de antimicrobianos, muitas vezes, considera os sintomas apresentados pelos pacientes e não tem embasamento em diagnósticos clínicos mais precisos que indique a necessidade de determinados antibióticos ou as dosagens apropriadas para cada caso (LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011). Geralmente, são vários fatores independentes associados ao não cumprimento das diretrizes para a profilaxia antimicrobiana, como a ausência de protocolos bem definidos, a falta de conhecimento e atualização, falta de comunicação ou discordância entre os profissionais prescritores e ausência de auditorias fiscais (CALBO et al., 2013). Por isso, é fundamental que todas as instituições de saúde e laboratórios de análises clínicas utilizem os mesmos procedimentos e critérios interpretativos, especialmente em caso de bactérias produtoras de carbapenemases (ANVISA, 2013).

A descoberta dos antibióticos, inicialmente a penicilina por Alexander Fleming em 1928, foi um marco na história da medicina e representou uma das intervenções mais importantes para o controle de doenças patogênicas. Até o início da década de 60, mais de 20 classes de antibióticos foram comercializadas mundialmente. No entanto, desde esse período, apenas duas novas classes foram incrementadas a este grupo de medicamentos (COATES; HALLS; HU, 2011).

Nas últimas décadas, a obtenção de novos princípios ativos eficazes e capazes de atingir alvos bacterianos distintos foi sendo significativamente reduzida, de modo que novas abordagens terapêuticas são imprescindíveis para minimizar os prejuízos gerados à saúde humana e de outros animais. Diante da problemática da resistência bacteriana, a busca por novas moléculas que apresentem aos menos um mecanismo sinérgico em associação aos fármacos já conhecidos, potencializando assim seus efeitos, vem se destacando e pode auxiliar a terapia de infecções causadas por micro-organismos (MABOU et al., 2016; KOBAYASHI, 2016).

3.6 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência aos antibióticos por bactérias patogênicas é relatada desde o início da utilização desses fármacos pelo homem, porém de baixa prevalência. A partir da distribuição de antibióticos em escala mundial foi observado um notável crescimento da resistência bacteriana. A resistência pode ocorrer espontaneamente por mutações pontuais, deleções ou inserções no material genético devido à exposição da bactéria a radiações ultravioleta, substâncias mutagênicas, entre outros, e pode ser adquirida pelos elementos genéticos móveis (BAQUERO; TEDIM; COQUE, 2013; ALÓS, 2015).

O aumento evolutivo do genoma destes micro-organismos intensificou a busca por novas sequências gênicas que foram sendo associadas com a resistência aos antimicrobianos e depositadas em bancos de dados, os quais estão se tornando cada vez mais abrangentes. De modo geral, os bancos de dados existentes além de armazenar podem trocar informações, para garantir que as sequências nucleotídicas já identificadas sejam acessadas mundialmente (ZANKARI et al., 2012; MARTINEZ; COQUE; BAQUERO, 2015).

Do ponto de vista ecológico, os genes de resistência aos antimicrobianos tornam favorável a competição por nutrientes na natureza, uma vez que, micro-organismos portadores desses genes podem se defender da ação de um agente antimicrobiano. Com isso, duas categorias de genes de resistência podem ser consideradas: uma relacionada com a defesa espontânea sobre a atividade dos agentes antimicrobianos, que são produzidos naturalmente por micro-organismos vizinhos; e outra adquirida por mecanismos de THG, inicialmente influenciada pelo uso de antimicrobianos por seres humanos (MARTINEZ; COQUE; BAQUERO, 2015).

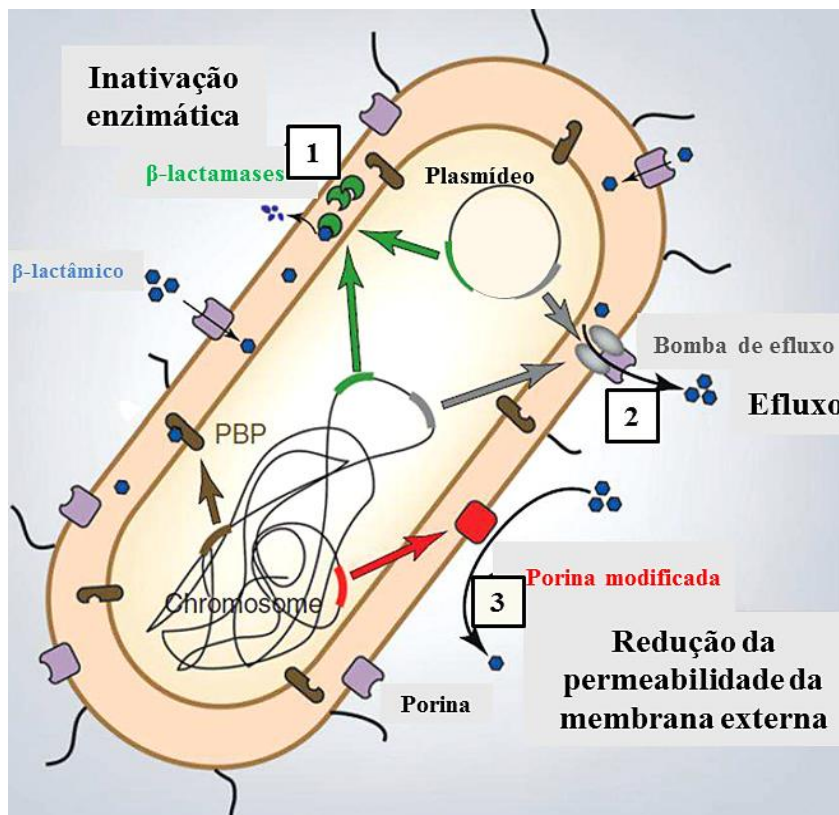
Uma das principais causas apontadas para o aumento crescente da resistência de bactérias aos antimicrobianos deve-se, em parte, a diversidade de genes de resistência que são identificados nesses patógenos. Entretanto, a prevalência da resistência bacteriana tanto a nível regional como em escala mundial é atribuída, em grande parte, aos mecanismos de disseminação de cepas altamente virulentas capazes de colonizar os mais diversos ambientes, bem como da pressão de seleção direta ou indireta pelo uso inadequado de antibióticos (SEDLAKOVA et al., 2014).

As bactérias Gram-negativas resistentes como, por exemplo, representantes da família Enterobacteriaceae, causam maior preocupação, uma vez que podem apresentar intrinsecamente resistência a diferentes agentes antimicrobianos. Além disso, um conjunto de fatores de virulência como uma membrana externa de baixa permeabilidade que limita a ultrapassagem de antibiótico, a codificação de enzimas que interferem na estrutura de antibióticos de uso mais restrito a exemplo dos betalactâmicos, ou a presença de proteínas de membrana especiais com a função de lançar para o meio extracelular esses compostos que podem ter efeitos deletérios, também são mecanismos de defesa desses micro-organismos (Figura 6) (TALBOT, 2013; CHAVES et al., 2016).

As características biológicas, físicas e químicas de ambientes impactados proporciona a formação de nichos diversos habitados por diferentes micro-organismos. A presença constante de resíduos farmacêuticos e metais pesados nestes ambientes, por exemplo, estimula bactérias a adquirir e propagar genes de resistência nos ecossistemas contaminados, até

mesmo aquelas inofensivas ao homem. Como a resistência a antimicrobianos e a metais, normalmente, ocorre por transferência de genes, bactérias ambientais podem desenvolver resistência a um desses compostos ou a outro ou ambos (TAHRANI et al., 2015; DI CESARE et al., 2016).

Figura 6: Mecanismos de resistência aos betalactâmicos em enterobactérias.



(1) Inativação enzimática do antibiótico por enzimas codificadas por plasmídeo. (2) Efluxo do antibiótico para fora da célula. (3) Redução da permeabilidade da membrana externa por modificações de porinas. Fonte: Adaptado de Nordmann, Dortet e Poirel (2012).

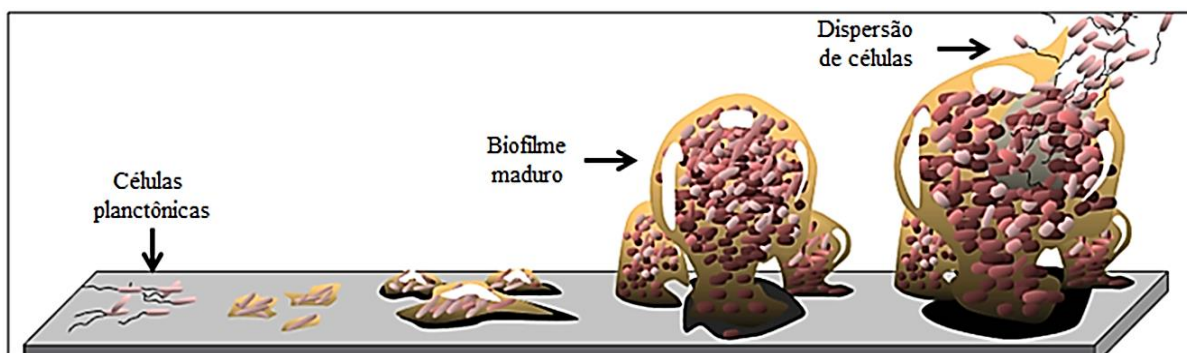
O meio ambiente abriga diversos genes de resistência, principalmente, em setores de despejo de esgoto, pois devido à quantidade de micro-organismos e antimicrobianos presentes, se desenvolve um espaço favorável para a troca de material genético e disseminação de cepas resistentes. Além disso, antimicrobianos podem ser utilizados na pecuária e na agricultura, possibilitando o risco de resistência cruzada entre patógenos (GARCIA-ALVAREZ et al., 2012; VAN ROSSUM et al., 2015). As rotas principais de transmissão de genes de resistência bacteriana por diferentes fontes podem ser observadas na Figura 7.

3.7 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A capacidade de adaptação, bem como as diferenças metabólicas e fisiológicas são características essenciais para que micro-organismos permaneçam em ambientes impactados. Um dos mecanismos adaptativos presentes em bactérias que vem sendo estudado é a formação de biofilme, que pode ser sucintamente explicado como a criação de um microambiente estruturado, que proporciona melhores condições de sobrevivência nos mais diversos ambientes (CHOUDURI; WADUD, 2014).

O biofilme é uma matriz polimérica formada por uma comunidade de bactérias aderidas a uma superfície de contato. A adesão bacteriana é o primeiro estágio para o desenvolvimento do biofilme, ocorrendo em superfícies abióticas como os dispositivos médicos e bióticas como dentes, tecidos e células. Inicialmente, na fase reversível do processo, a adesão entre bactérias e superfícies abióticas é conduzida por interações físico-químicas, enquanto que a aderência em superfícies bióticas é mediada por interações moleculares. Após o estabelecimento e amadurecimento da matriz protetora na fase irreversível, o ciclo é finalizado com a ruptura do biofilme e a liberação das células bacterianas (Figura 8) (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Figura 8: Representação das etapas da adesão e formação de biofilme bacteriano.



Fonte: Adaptado de Monroe (2007).

As bactérias de vida livre (planctônicas) podem ser encontradas no ar, na água, no solo ou em associação com tecidos de animais ou vegetais. Entretanto, a forma de células livres não é encontrada frequentemente na natureza, a maioria das bactérias vivem em comunidades ou aderidas às suas superfícies de equipamentos clínicos e industriais. Os fatores que contribuem para a adesão bacteriana incluem flagelos, fímbrias, adesinas e polímeros, além de forças de adesão como atração eletrostática e hidrofóbica, interações de van der Waals, pontes de hidrogênio e ligações covalentes (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A hidrofobicidade constitui um dos importantes fatores físico-químicos que influenciam o processo de adesão microbiana em diferentes substratos. O método comumente utilizado para avaliar esse parâmetro, foi desenvolvido por Rosenberg et al. (1980), o qual se baseia nas leituras de absorbância de células bacterianas ligadas a um hidrocarboneto em solução aquosa. De modo geral, os métodos existentes para avaliar a hidrofobicidade da superfície celular, podem medir apenas a interação entre células e um material hidrofóbico ou hidrofílico. Com isso, fatores adicionais como a rugosidade da superfície de contato, as interações celulares e propriedades biológicas de cada célula devem ser considerados, pois podem influenciar nos resultados (WANG; LEE; DYKES, 2014).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos e a consequente proteção ao sistema imunológico do hospedeiro, se destacam como as principais causas de complicações clínicas em pacientes com cateteres urinários ou venosos, e podem ser reforçadas pela formação de biofilmes nas paredes internas dos cateteres. A espécie *P. mirabilis*, quando associada a infecções urinárias, se destaca no bloqueio de cateteres devido à produção de urease e formação de biofilme. A maioria dos pacientes infectados por essa bactéria ao fazer uso de cateter desenvolvem, posteriormente, cálculos renais (JACOBSEM; SHIRTLIFF, 2011; JORDAN et al., 2015).

Dentre os inúmeros fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade dessa espécie, a expressão de diferentes tipos de fímbrias adesinas constitui um grave problema de urovirulência uma vez que a presença da adesina celular uroepitelial (ACU), por exemplo, desempenha um importante papel na colonização do trato urinário (PELLEGRIMO et al., 2013). Estas adesinas uroepiteliais foram identificadas pela primeira vez por Wray e seus colaboradores (1986) e foram indicadas como responsáveis pela fixação de estirpes de *P. mirabilis* nas vias urinárias.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), tem se mostrado uma importante ferramenta para visualização da formação de biofilme cristalino, muito embora, a preparação de amostras de biofilmes em desenvolvimento seja um procedimento trabalhoso. Além desse instrumento de estudo, a microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEVA) possibilita uma visão mais detalhada sobre o processo de formação de biofilmes em cateteres urinários. A combinação dessas ferramentas pode fornecer melhores informações sobre a morfologia e composição de biofilmes cristalinos (HOLLING et al., 2014).

As análises microscópicas, de modo geral, vêm sendo fundamentais para o entendimento de fatores envolvidos na formação de biofilme bacteriano. Fernández-Delgado et al. (2015), com o objetivo de avaliar e comparar a adesão de diferentes cepas de *P.*

mirabilis, utilizaram a microscopia eletrônica de transmissão (MET). O estudo mostrou a abundância de fímbrias adesinas em 100% das células estudadas, que podem estar relacionadas com a aderência superficial. Outro estudo, realizado por Czerwonka et al. (2016), utilizou a microscopia de epifluorescência para analisar o perfil de hidrofobicidade celular de cepas dessa mesma espécie em diferentes superfícies, e constatou-se uma maior produção de biofilme nas bactérias com superfície celular hidrofílica.

As bactérias envolvidas no processo de formação de biofilme podem estabelecer interações entre si e aumentar a quantidade de nutrientes necessários através da deposição e concentração da matriz polimérica. Além disso, devido à proximidade de bactérias no estado de biofilme, pode ocorrer troca de material genético através de elementos genéticos móveis (MADSEN et al., 2012). Desse modo, a capacidade de formar biofilme se revela como um potencial mecanismo de resistência, pois além de garantir a sobrevivência bacteriana no decorrer dos anos, facilita o surgimento de cepas multirresistentes que são rapidamente disseminadas no meio ambiente (KRAGH et al., 2016).

3.8 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Nos últimos anos, muitas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para avaliar a diversidade de micro-organismos. A diversidade genética de linhagens bacterianas pode ser analisada através da técnica de consenso intergênica repetitiva de enterobactérias (ERIC). A amplificação de sequências de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser feita com um par de iniciadores (*primers*) específicos ou vários pares e permite a diferenciação de estirpes, além de apresentar boa reprodutibilidade (ZOTHANPUIA et al., 2016).

Inicialmente, esse método de tipagem genética foi utilizado no sequenciamento dos genomas de *E. coli* e de *Salmonella typhimurium* por Hulton e colaboradores (1991). Mais recentemente, Wei et al. (2014) utilizaram a técnica do ERIC-PCR para identificar classes funcionais de integrons em isolados clínicos de *P. mirabilis*. Outros estudos de genotipagem também fizeram uso da técnica sobre diferentes espécies bacterianas (KHOSRAVI et al., 2016; SEIFI et al., 2016).

Os métodos epidemiológicos moleculares estão sendo vantajosos para a detecção e controle de infecções causadas por bactérias. A combinação de técnicas de genotipagem como ERIC e DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) oferecem mais informações epidemiológicas do que o uso desses métodos isolados. Além do mais, são de baixo custo financeiro e menos complicado do que a maioria dos métodos de tipagem molecular (KHOSRAVI et al., 2015). A técnica de rep-PCR baseada em sequência de elementos

repetitivos (ERIC-PCR e BOX-PCR) é uma ferramenta molecular utilizada para a discriminação de diferentes espécies, uma vez que utiliza vários segmentos de DNA presentes no genoma bacteriano (KUMAR; KUMAR; PRATUSH, 2014; ZOTHANPUIA et al., 2016).

Além destes, o método de tipagem de sequência multilocus (MLST) e a eletroforese em campo pulsado (PFGE) também são muito utilizados, sendo que o PFGE é considerado o padrão-ouro dentre os diferentes métodos de genotipagem de procariotos, devido a sua reprodutibilidade (LIU et al., 2017; KOTTWITZ; OLIVEIRA, 2011). No entanto, trata-se de uma técnica mais trabalhosa e de custo financeiro mais elevado.

Em estudos de caracterização de bactérias resistentes a antimicrobianos isoladas de fontes hídricas, o método de ERIC-PCR tem se mostrado satisfatório, pois tem apresentado capacidade discriminatória para diferenciar espécies bacterianas (XU et al., 2016; COHEN et al., 2016). A aplicação de outras ferramentas moleculares como a citometria de fluxo (CF) e o sequenciamento do gene *16S rDNA* também têm sido relevantes para a caracterização de procariotos em *habitats* aquáticos (LIU et al., 2016). Além destes métodos, a metagenômica, permite a análise do genoma de diferentes comunidades microbianas e pode ser utilizada para a identificação de biomarcadores em ambientes específicos como, por exemplo, ecossistemas aquáticos impactados (VAN ROSSUM et al., 2015).

4 ANEXO 1

Análise comparativa de isolados clínicos e ambientais de *Proteus mirabilis* resistentes e formadores de biofilme

Sivoneide Maria da Silva,¹ Lívia Caroline de Alexandre Araújo,¹ José Adelson Alves do Nascimento Junior,¹ Túlio Diego da Silva,² Antônio Pereira das Neves Neto,³ Ana Catarina Souza Lopes,⁴ Maria Tereza dos Santos Correia¹, Maria Betânia Melo de Oliveira¹ Márcia Vanusa da Silva,^{1*}

¹*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.*

²*Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife, PE, Brasil.*

³*Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz-Pernambuco, Recife, PE, Brazil.*

⁴*Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.*

**Autor correspondente:*

Márcia Silva – Departamento de Bioquímica/UFPE

Av. Moraes Rego s/n, CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: marciavanusa@yahoo.com.br

Periódico: *Genetics and Molecular Biology*

Resumo

Proteus mirabilis é um bacilo Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae e pode causar infecções decorrentes de alimentos e ambientes contaminados. Este estudo investigou o perfil de resistência, a formação de biofilme e a diversidade genética de oito isolados, obtidos de um ambiente aquático impactado, e de três isolados clínicos para fins comparativos. Foram realizados testes bioquímicos para avaliar o perfil de susceptibilidade, o perfil de hidrofobicidade e a formação e erradicação de biofilme. A diversidade genética dos isolados foi analisada pela técnica de ERIC-PCR. Dois isolados clínicos (ICP4, ICP5) se mostram multirresistentes, enquanto que os isolados ambientais apresentaram resistência apenas a tetraciclina, exceto o CP₅25S que se mostrou resistente também a ampicilina. Todos os isolados se mostraram capazes de formar biofilme em diferentes meios de crescimento. Quanto a erradicação do biofilme, parte dos antimicrobianos testados foram capazes de erradicar o biofilme dos isolados clínicos ($\geq 50\%$), porém, todos, erradicaram mais de 50% o biofilme dos isolados ambientais. No perfil de hidrofobicidade, três isolados ambientais se mostraram moderadamente hidrofóbicos e os demais hidrofílicos. A multirresistência dos isolados hospitalares pode ser adquirida, uma vez que esse ambiente abriga diversos genes de resistência. Por outro lado, a expressiva formação de biofilme, sobretudo pelos isolados ambientais, indica um mecanismo de proteção em resposta ao ambiente impactado no qual vivem, independe da significativa erradicação de biofilme, pois esses isolados podem não está sob pressão seletiva direta a estes antimicrobianos. Os isolados se mostraram majoritariamente hidrofílicos com baixa capacidade de aderência em lamínulas de vidro, possivelmente, devido a forças repulsivas. A ERIC-PCR revelou um alto grau de similaridade genética entre os isolados, demonstrando relação clonal entre os mesmos. Os dados obtidos revelam a presença de enterobactérias potencialmente produtoras de biofilme no ambiente aquático estudado representando, assim, um problema de saúde pública.

Palavras-chave: ambiente aquático, biofilme, diversidade genética

Introdução

O descarte inadequado de efluentes domésticos e industriais em ecossistemas aquáticos de água doce tem limitado a disponibilidade dos recursos hídricos já escassos e comprometido às relações entre os seres vivos. Como a decomposição de substâncias orgânicas por algumas espécies de fungos e bactérias é um processo ecológico natural, a quantidade de dejetos urbanos em corpos hídricos atrai uma quantidade significativa desses agentes decompositores, reduzindo o oxigênio presente na água e causando desequilíbrio nas comunidades naturais (Batista *et al.*, 2016).

A presença de bactérias resistentes no ambiente aquático, provenientes dos seres humanos e animais expostos a antimicrobianos, é um dos principais problemas desse ecossistema (Osińska *et al.*, 2016; Poma *et al.*, 2016). Os corpos hídricos impactados pela ação antrópica são nichos ecológicos considerados eficientes para a seleção de populações bacterianas resistentes a antimicrobianos, através da transferência de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons. A aquisição de um perfil genético aprimorado aumenta a adaptabilidade e perpetuação dessas espécies, levando ao surgimento de cepas multirresistentes e portadoras de variados fatores de virulência (Nazaret e Aminov, 2014; Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

O riacho Cavouco é um afluente da bacia hidrográfica do rio Capibaribe, fonte de recursos hídricos para a maioria das indústrias e áreas de irrigação de alimentos no estado de Pernambuco. Durante o seu percurso, esse riacho recebe uma significativa contribuição de resíduos poluidores provenientes de laboratórios de ensino e pesquisa, além de resíduos hospitalares e efluentes domésticos (Araújo *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2016). Vários gêneros bacterianos já foram identificados fenotípica e molecularmente nesse ambiente (Purificação-Júnior *et al.*, 2017).

Um dos gêneros corresponde ao táxon *Proteus*, que atualmente é representado por quatro espécies: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Proteus hauseri* e três genomoespécies que ainda não foram nominadas (Drzewiecka, 2016). Normalmente, esses micro-organismos vivem em ambientes naturais, mas podem ser encontrados no trato gastrointestinal humano e de outros animais. Essas espécies, tanto de origem comunitária quanto hospitalar, podem causar diferentes infecções decorrentes de alimentos e ambientes contaminados, além de profissionais de saúde que podem ser veículos de transmissão (Park *et al.*, 2012).

Proteus mirabilis é uma das espécies desse gênero que mais se destaca, sendo mais conhecida por causar infecções do trato urinário, especialmente, em pacientes submetidos a

longos períodos de cateterismo e imunocomprometidos. Um conjunto diversificado de fatores de virulência é utilizado por essa bactéria para colonizar o trato urinário de pacientes debilitados incluindo urease, proteases, toxinas, aquisição de ferro e zinco, enxameação, fímbrias e formação de biofilme (Schaffer e Pearson, 2015).

O presente estudo objetiva caracterizar e comparar genética e bioquimicamente isolados ambientais e clínicos de *P. mirabilis* a fim de alertar as políticas de saúde pública para a exposição de bactérias aos agentes poluidores e disseminação de bactérias resistentes e produtoras de biofilme em ambientes aquáticos impactados.

Materiais e Métodos

Material biológico e condições de cultivo

Foram investigados oito isolados da espécie *Proteus mirabilis* previamente caracterizados fenotipicamente. Os isolados armazenados com glicerol (15 %) no Deep Freezer a -80°C foram reativados para análises posteriores no meio de crescimento Brain Heart Infusion (BHI) e plaqueados em agar BHI. Uma cepa de *P. mirabilis* (UFPEDA 767), obtida da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos (UFPE), foi utilizada como controle de referência e três isolados clínicos: ICP3 (urina), ICP4 (sangue) e ICP5 (ponta de cateter), para estudo comparativo.

MALDI-TOF Mass Spectrometry

As colônias bacterianas foram ressuspensas em 300 µL de água Milli-Q e depois adicionados 900 µL de etanol absoluto. As suspensões foram centrifugadas a 15.600 g por 2 min, o sobrenadante removido e o sedimento foi seco em SpeedVac por 5 min. Em seguida, foram adicionados 50 µL de ácido fórmico a 70%, 50 µL de acetonitrila, a mistura homogeneizada em agitador vortex, centrifugada a 15.600 g por 2 min e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. A matriz foi preparada com ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL) em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,3% e aplicada na placa de MALDI com a amostra em temperatura ambiente para cristalização. A aquisição dos espectros de MS em modo linear positivo (Voltagem de aceleração: 20 kV e Faixa de detecção - m/z: 2.000 – 20.000) foi realizada pelo Programa Flex Control Version 3.0 em Espectrômetro de Massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

Os espectros de massa obtidos foram comparados com o Banco de Dados MALDI Biotyper Version 3.1.

Perfil de suscetibilidade

Todos os isolados foram testados quanto à susceptibilidade a dez antimicrobianos, de acordo com suas classes e espectro de ação: Ampicilina (AMP) 10 µg, Cefazolina (CFZ) 30 µg, Cefalotina (CFL) 30 µg, Cefepima (CPM) 30 µg, Meropenem (MER) 10 µg, Gentamicina (GEN) 10 µg, Amicacina (AMI) 30 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5 µg, Tetraciclina (TET) 30 µg e Trimetoprim (TRI) 5 µg. Os experimentos foram realizados em triplicata por meio do antibiograma, método de Kirby-Bauer (difusão em discos), conforme as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2015).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos para os quais as bactérias apresentaram resistência foi realizada segundo a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do CLSI (2015). As medições básicas quantitativas da atividade *in vitro* foram obtidas a partir das leituras de densidade óptica (DO) em um leitor de microplacas (FLx800™ Multi-Detection) no comprimento de onda 600 nm.

Perfil de hidrofobicidade

A Hidrofobicidade da Superfície Celular (HSC) foi determinada com base no método de ligação a hidrocarboneto utilizado por Tendolkar *et al.* (2004), com algumas adaptações. Os isolados bacterianos crescidos em caldo BHI a 37°C/18h, foram transferidos para microtubos e centrifugados por 10 min (7.000 rpm). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em tampão PUM (Fosfato de Potássio Trihidratado e Monobásico, Ureia e Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado) e ajustado para 0,5 obtendo-se a leitura inicial (DO_i) a 600 nm. Posteriormente, acrescentou-se o hidrocarboneto para-xileno, e submeteu-se a agitação em vortex por 2 min. Após a separação das fases, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura final (DO_f) a 600 nm da fase inferior de cada microtubo. Para determinar a HSC (%), foi utilizada a fórmula: $HSC (\%) = (DO_i - OD_f) / OD_i \times 100$. As bactérias que apresentaram HSC (%) inferior a 30% foram consideradas hidrofílicas e com HSC (%)

superior a 70%, hidrofóbicas. As amostras que apresentaram HSC entre 30% e 70% foram classificadas como moderadamente hidrofóbicas.

Formação de biofilme

A formação de biofilme pelos isolados de *P. mirabilis* foi verificada em placas de microtitulação de poliestireno pelo método de cristal violeta (Stepanovic *et al.*, 2007), em diferentes meios de cultura: Luria Bertani Miller (LB Miller), Tryptose Soy Broth (TSB) e BHI. A partir das leituras de densidade óptica (DO), foi determinada a média dos valores da absorbância de cada amostra (DO_a) em comparação com a absorbância do controle de esterilidade (DO_c). As amostras foram classificadas como fortes ($4x DO_c < DO_a$), moderadas ($2x DO_c < DO_a \leq 4x DO_c$) e fracas ($DO_c < DO_a \leq 2x DO_c$) formadoras de biofilme. Os isolados que apresentaram valores de absorbância igual ou inferior ao controle de esterilidade foram classificados como não produtores de biofilme.

Erradicação de biofilme

A avaliação da erradicação do biofilme formado pelos isolados foi realizada de modo semelhante até o procedimento de retirada do inóculo e lavagem das placas com solução de NaCl a 0,9% estéril (Stepanovic *et al.*, 2007). Na sequência, foi acrescentando meio estéril TSB (180 μ L) e cada antimicrobiano (20 μ L) em suas respectivas concentrações de CIM descritas pelo CLSI (2015), e as placas foram incubadas a 37°/24h. Transcorrido esse tempo, foi realizada a revelação com cristal violeta.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Após o crescimento bacteriano em lamínulas de vidro (24h/37°C), as amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M, pH, 7,4 para posterior fixação em tampão fosfato 0,1 M e glutaraldeído a 2,5%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1 M por 90 min. Em seguida foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1 M para desidratação, utilizando uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 3x de 100% por 10 min cada etapa. Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem em stubs metálico utilizando uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foi

realizada a metalização cobrindo o material com uma fina camada de ouro para a visualização no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada com kit PureLink® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi avaliada a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a corrida, o gel foi observado em transiluminador UV e fotodocumentado. A concentração do DNA foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop 2000) nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, obtendo-se a estimativa da quantidade de DNA presente na amostra e o grau de pureza.

ERIC-PCR

Para amplificação das sequências ERIC por PCR foi utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ERIC-R1 (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC 3') e ERIC-R2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') (Duan *et al.*, 2009). As misturas contendo 1,52 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTP's, 40 pmol/uL de cada *primer*, 1U Taq DNA Polymerase, 1x de tampão de reações e 100 ng de DNA em volume final de 25 µL. A amplificação das amostras foi realizada em aparelho termociclador (C1000 Thermal Cyclor – BioRad), programado com um ciclo inicial de 3 min a 95°C, seguido de 40 ciclos (1 min de 92°C, 1 min de 36°C e 8 min de 72°C) e uma etapa final de extensão de 16 min a 72°C (Cabral *et al.*, 2012). A qualidade dos produtos amplificados foi analisada em gel de agarose a 1,5%, submetido a uma corrente elétrica de 80v por 3h, utilizado o marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. O dendrograma foi construído pelo software NTSYS-pc (Numerical Taxonomy System, Version 2.0) a partir de uma matriz binária baseada na presença ou ausência de bandas.

Resultados

Identificação bacteriana

Todos os isolados bacterianos estudados foram confirmados pela técnica de MALDI-TOF-MS como *P. mirabilis*, apresentando valores de Score entre 2.300 e 3.000. Esses valores

de Score fixados no Banco de Dados Biotyper indicam a identificação de micro-organismos com alto índice de compatibilidade ao nível de espécies (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação dos isolados bacterianos por aquisição de espectros de massa.

Analito	Organismo (Melhor compatibilidade)	Valor (Score)
767	<i>Proteus mirabilis</i>	2.395
ICP3	<i>Proteus mirabilis</i>	2.381
ICP4	<i>Proteus mirabilis</i>	2.455
ICP5	<i>Proteus mirabilis</i>	2.504
CP ₃ 5S	<i>Proteus mirabilis</i>	2.426
CP ₅ 22S	<i>Proteus mirabilis</i>	2.421
CP ₅ 23S	<i>Proteus mirabilis</i>	2.434
CP ₅ 25S	<i>Proteus mirabilis</i>	2.421
CP ₅ 26P	<i>Proteus mirabilis</i>	2.400
CP ₅ 27P	<i>Proteus mirabilis</i>	2.404
CP ₅ 28P	<i>Proteus mirabilis</i>	2.426
CP ₅ 29P	<i>Proteus mirabilis</i>	2.354

Perfil de suscetibilidade e CIM

Foi observado um perfil de resistência/susceptibilidade distinto entre os isolados clínicos e ambientais. Os isolados clínicos apresentaram maior perfil de resistência, exceto o isolado ICP3, que apresentou resistência apenas para tetraciclina. Os isolados ICP4 e ICP5 apresentaram resistência para mais de um antimicrobiano: ampicilina, cefazolina, tetraciclina e trimetoprim. Além destes, o isolado ICP4 apresentou resistência a meropenem, importante antibiótico da classe dos carbapenêmicos, e o isolado ICP5 também apresentou resistência a mais outro antimicrobiano, amicacina, pertencente a classe dos aminoglicosídeos. Todos os isolados ambientais se mostraram resistentes apenas a tetraciclina, com exceção do isolado CP₅25S, que apresentou resistente também a ampicilina. De uma forma geral as bactérias foram mais resistentes a tetraciclina, seguido de ampicilina. Aos demais antimicrobianos testados, todas as bactérias utilizadas neste ensaio, se mostram sensíveis.

Os diferentes perfis de resistência encontrados após a interpretação do antibiograma, bem como os resultados da CIM dos antimicrobianos aos quais as bactérias apresentaram resistência podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização bioquímica dos isolados de *P. mirabilis* estudados.

Isolados	Perfil de resistência	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Hidrofobicidade	Biofilme	Erradicação de biofilme ($\geq 50\%$)
767	TET	≥ 16	Hidrofílico	FR	-
ICP3	TET	≥ 16	Hidrofílico	FO	GEN, AMI, CIP, TET, TRI
ICP4	AMP, CFZ, CFL, MER, TET, TRI	$\leq 128, \leq 64, \leq 64, \geq 16, \geq 16, \leq 128$	Hidrofílico	FO	GEN, CIP, TET, TRI
ICP5	AMP, CFZ, CFL, AMI, TET, TRI	$\geq 128, \geq 128, \geq 128, \leq 32, \geq 32, \leq 128$	Hidrofílico	MO/FO	CPM, GEN, AMI, CIP, TET, TRI
CP ₃ 5S	TET	≤ 8	MO/Hidrofóbico	FO	AMP, CFZ, CFL, CPM, MER, GEN, AMI, CIP, TET, TRI
CP ₅ 22S	TET	≤ 16	Hidrofílico	FO	AMP, CFZ, CFL, CPM, MER, GEN, AMI, CIP, TET, TRI
CP ₅ 23S	TET	≤ 16	Hidrofílico	FO	AMP, CFZ, CFL, CPM, MER, GEN, AMI, CIP, TET, TRI
CP ₅ 25S	AMP, TET	$\leq 8, \leq 16$	MO/Hidrofóbico	MO/FO	AMP, CFZ, CFL, CPM, MER, GEN, AMI, CIP, TET, TRI
CP ₅ 26P	TET	≤ 8	Hidrofílico	FO	AMP, CFZ, CFL, CPM, MER, GEN, AMI, CIP, TET, TRI
CP ₅ 26P	TET	≤ 8	Hidrofílico	FO	AMP, CFZ, CFL, CPM, MER, GEN, AMI, CIP, TET, TRI
CP ₅ 28P	TET	≤ 8	MO/Hidrofóbico	FO	AMP, CFZ, CFL, CPM, MER, GEN, AMI, CIP, TET, TRI
CP ₅ 29P	TET	≤ 8	Hidrofílico	FO	AMP, CFZ, CFL, CPM, MER, GEN, AMI, CIP, TET, TRI

FR: Fraco; MO: Moderado; FO: Forte. Ampicilina (AMP); Cefazolina (CFZ); Cefalotina (CFL); Cefepima (CPM); Meropenem (MER); Gentamicina (GEN); Amicacina (AMI); Ciprofloxacina (CIP); Tetraciclina (TET); Trimetoprim (TRI).

Hidrofobicidade da superfície celular das amostras

A HSC das amostras foi determinada a partir das leituras espectrofotométricas. Dentre os isolados analisados, apenas três ambientais (CP₃5S, CP₅25S e CP₅28P) se mostraram moderadamente hidrofóbicos com HSC (%) entre 30% e 40%. Os demais exibiram um perfil de superfície celular hidrofílico com porcentagens inferiores a 30% (Figura 1).

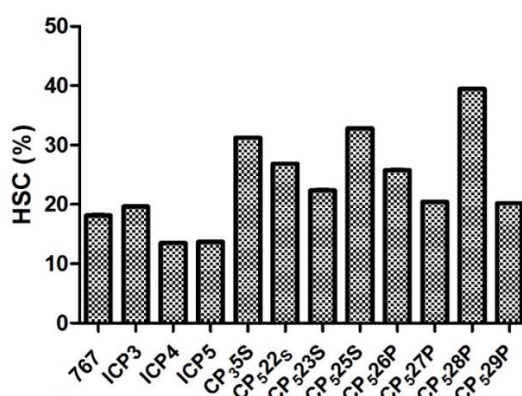


Figura 1 - Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de isolados clínicos e ambientais de *P. mirabilis*. Hidrofobicidade da Superfície Celular (HSC).

Quantificação e erradicação de biofilme bacteriano

Na quantificação de biofilme, todos os isolados ambientais e clínicos formaram biofilme nos três meios testados (LB, BHI e TSB), com maior intensidade nos dois últimos (BHI e TSB). No entanto, a maior formação de biofilme foi observada nos isolados ambientais. A cepa 767 foi classificada como fraca produtora de biofilme (Figura 2).

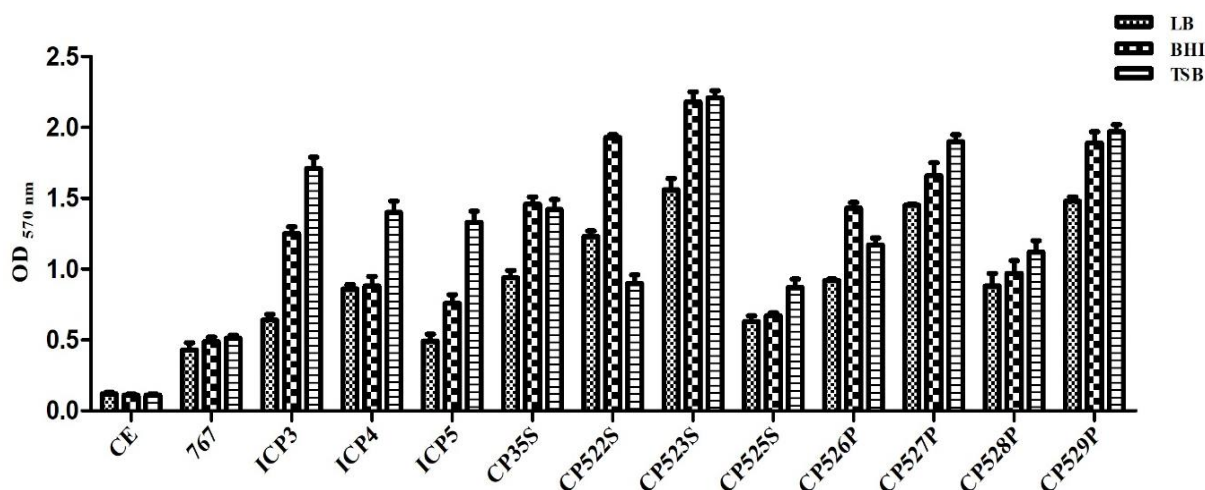


Figura 2 - Formação de biofilme em diferentes meios de crescimento. CE: controle de esterilidade.

Além de quantificar a formação de biofilme, foi avaliado no presente estudo a capacidade dos antimicrobianos, utilizados no perfil de suscetibilidade, de erradicar o biofilme formado em TSB, uma vez que a maioria dos isolados demonstrou produzir mais biofilme nesse meio de cultivo. O biofilme dos isolados ambientes foi erradicado em mais de 50% para todos os antibióticos testados. Enquanto que, entre os isolados clínicos, parte dos antimicrobianos foi capaz de erradicar o biofilme formado ($\geq 50\%$) (Tabela 2).

Análise de biofilme por MEV

Do número total dos isolados, foram escolhidos para análise em microscopia a cepa 767, um isolado clínico (ICP3) e outro ambiental (CP₅23S), ambos produtores de biofilme pelo método quantitativo utilizado neste estudo. Na cepa controle não foram observadas diferenças notáveis em sua morfologia, mas foi possível observar a presença de células alongadas e filamentos fimbriares nos isolados ICP3 e CP₅23S. (Figura 3). Contudo, são necessários ensaios adicionais utilizando outras estratégias para análise do material e possível visualização do biofilme em MEV.

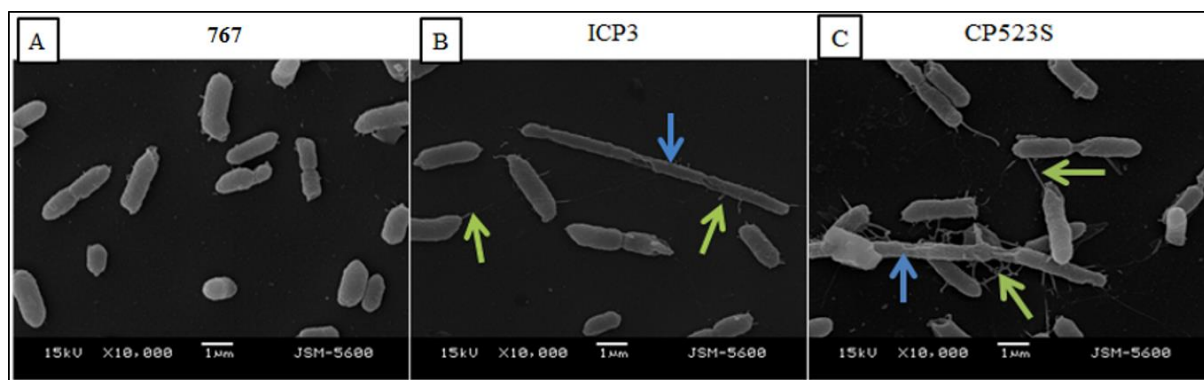


Figura 3 - Visualização de isolados de *P. mirabilis* por MEV. A: Células típicas de enterobactérias em forma de bacilos. B e C: Células enxame alongadas (seta azul), fímbrias adesinas (setas verdes).

Diversidade genética

Os padrões de bandas obtidos apresentaram pouca diversidade genética entre os isolados. A distribuição dos fragmentos ocorreu de forma uniforme com repetições na região entre 700 pb e 1.650 pb. Foi realizada uma caracterização e agrupamento dos isolados de acordo com as análises realizadas. As observações permitiram agrupar os isolados em quatro grupos (I a IV). O grupo I incluiu 767 e CP₅26P, com o mesmo perfil de resistência e hidrofobicidade. O grupo II apresentou maior número de isolados, três clínicos e três ambientais tendo em comum formação de biofilme e, em parte, o perfil de hidrofobicidade. O terceiro grupo (III) foi representado apenas pelo isolado CP₅23S possuindo um padrão diferenciado dos demais grupos sendo o isolado que mais produziu biofilme nos diferentes meios testados. O quarto e último grupo (IV) foi representado por três isolados (todos ambientais) com o mesmo perfil de resistência, formação de biofilme e a erradicação do biofilme (Figura 4).

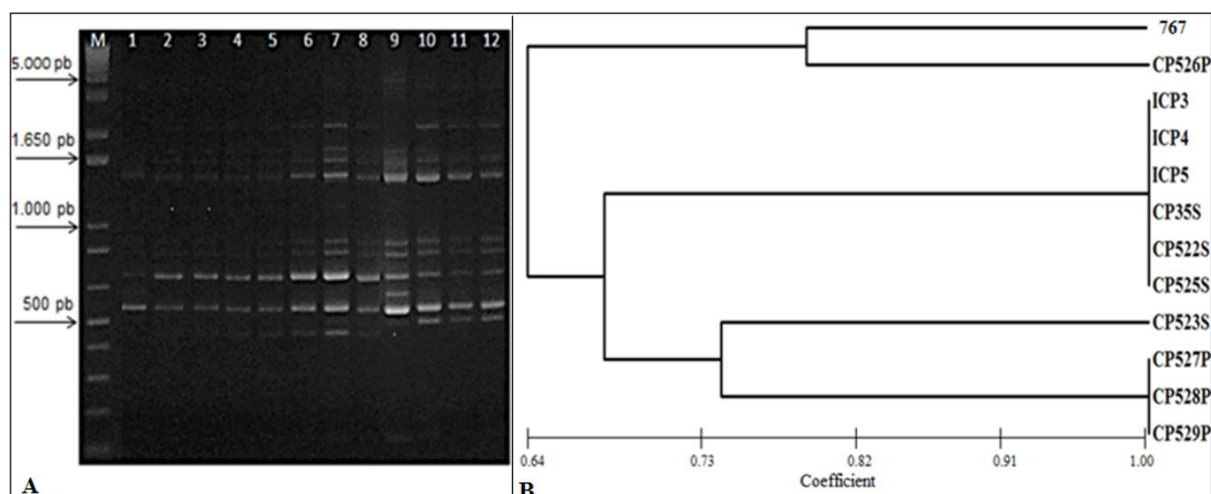


Figura 4 - Diversidade genética dos isolados através da técnica de ERIC-PCR. (A) Eletroforese dos produtos da PCR. M: Marcador molecular; 1: 767; 2: ICP3; 3: ICP4; 4: ICP5; 5: CP₃5S; 6: CP₅22S; 7: CP₅23S; 8: CP₅25S; 9: CP₅26P; 10: CP₅27P; 11: CP₅28P; 12: CP₅29P. (B) Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS Versão 2.0.

Discussão

A identificação dos isolados pela tecnologia de MALDI-TOF-MS se mostrou eficiente com alto grau de similaridade entre os espectros obtidos e as informações armazenadas na base de dados. Os espectros de massa gerados são únicos para cada micro-organismo analisado, por isso, são considerados confiáveis para a distinção de bactérias ao nível de gênero e espécies (Croxatto et al., 2012; Wattal et al., 2016). Na literatura, ainda não foram relatados estudos de caracterização de isolados dessa espécie proveniente de ambientes impactados por essa tecnologia.

O perfil de sensibilidade/resistência mostrou que todos os isolados são resistentes a tetraciclina. No entanto, documentos internacionais, a exemplo do CLSI, relata que algumas espécies bacterianas como *P. mirabilis* já apresentam resistência intrínseca a esse antimicrobiano. Por outro lado, a resistência a ampicilina pelo isolado CP₅25S pode ser adquirida. A aquisição de genes de resistência no solo e na água pode ocorrer através da transferência horizontal de genes (THG), conforme observaram Santamaría *et al.* (2011), ao identificarem uma ampla diversidade de genes de resistência a tetraciclina no trato intestinal de animais de pastagem, além de uma considerável distribuição espacial de genes *tet* na água de escoamento sendo esta, portanto, um meio de disseminação de genes resistência.

Os resultados aqui apresentados confirma a presença de enterobactérias, como a espécie *P. mirabilis* no riacho Cavouco (Purificação-Júnior *et al.*, 2017) e a possibilidade de disseminação de resistência a antimicrobianos devido ao descarte de dejetos urbanos nesse

ambiente. O meio ambiente abriga diversos genes de resistência, principalmente, em setores de despejo de esgoto, pois devido à quantidade de micro-organismos e resíduos farmacêuticos presentes, se desenvolve um espaço favorável para a troca de material genético e disseminação de cepas resistentes (Garcia-Alvarez *et al.*, 2012; Van Rossum *et al.*, 2015).

Os isolados ICP4 e ICP5 apresentaram resistência a outros antimicrobianos como os betalactâmicos e aminoglicosídeos, respectivamente, que são utilizados para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias multirresistentes. Esse dado revela que, provavelmente, esse perfil corresponde a uma resistência adquirida devido a pressão de seleção direta no ambiente hospitalar a estes antimicrobianos (Sedláková *et al.*, 2014).

A expressão de genes de resistência diretamente a antimicrobianos pode não ser um fator determinante ou exclusivo para a sobrevivência bacteriana. Outros mecanismos alternativos podem ser utilizados como a formação de biofilme, resultante da capacidade de aderência microbiana em superfícies de contato (Douterelo *et al.*, 2016). Os fatores que contribuem para a adesão bacteriana incluem flagelos, fímbrias, adesinas e polímeros, além de forças de adesão como atração eletrostática e hidrofóbica (Flemming e Wingender, 2010).

No presente estudo foi avaliada a hidrofobicidade celular, a capacidade de formação de biofilme e erradicação do mesmo. Os isolados que se mostraram hidrofílicos, exceto 767, formaram biofilme com maior intensidade corroborando com o estudo recente, no qual correlaciona a baixa hidrofobicidade da superfície celular de cepas de *P. mirabilis* com a alta capacidade de produção de biofilme (Czerwonka *et al.*, 2016). Os Três isolados ambientais moderadamente hidrofóbicos são formadores de biofilme, porém com menor intensidade, comparados aos demais do ambiente aquático. Sendo assim, o perfil obtido neste trabalho, surge baixa hidrofobicidade em isolados formadores de biofilme. O conhecimento sobre forças de adesão hidrofóbicas de bactérias formadoras de biofilme é relevante para direcionar a síntese de biomateriais anti-infecciosos por meio de repulsão eletrostática (Trentin *et al.*, 2014). Entretanto, a combinação de diferentes métodos pode oferecer informações mais precisas, uma vez que, não existe um padrão definido de avaliação do perfil de hidrofobicidade. O método mais utilizado mede a interação entre células e um agente de adesão, normalmente, um hidrocarboneto (Wang *et al.*, 2014).

A maioria das bactérias vive em comunidades na natureza ou aderidas às superfícies de biomateriais, por exemplo, dificultando o tratamento de infecções hospitalares. Bactérias em biofilme, devido a proximidade, podem adquirir resistência a antimicrobianos por meio de THG, além de se protegerem de diversos fatores externos como variações de temperatura, pH e substâncias químicas (Madsen *et al.*, 2012). Com isso, a capacidade de formar biofilme se

revela como um vantajoso mecanismo de resistência, pois além de garantir a sobrevivência em diferentes condições ambientais e, em alguns casos, facilita o surgimento de novas populações.

As diversas condições ambientais contribuem para a dinâmica de sobrevivência bacteriana no meio em que vivem, impulsionando a aquisição de diferentes fatores de resistência (Douterelo *et al.*, 2016; Baqueiro *et al.*, 2015). No presente estudo, todos os antimicrobianos testados foram capazes de erradicar ($> 50\%$) o biofilme formado pelos isolados ambientais, enquanto que nos isolados clínicos, parte dos antimicrobianos apresentaram essa capacidade ($\geq 50\%$). Os resultados obtidos sugerem que a frequente exposição de bactérias a diferentes agentes antimicrobianos nos hospitais favorece a tolerância aos mesmos e a aquisição de variados fatores de resistência, diferente de isolados ambientes que podem não está diretamente sob a mesma pressão de seleção ambiental.

As propriedades físicas e químicas de superfície bióticas e abióticas, bem como as características de cada micro-organismo podem influenciar a adesão bacteriana que, mais frequentemente, se aderem em superfícies hidrofóbicas como materiais plásticos do que em vidro ou metais, que apresentam superfícies hidrofílicas (Pavithra *et al.*, 2008; Trentin *et al.*, 2013). Com base em forças repulsivas, pesquisadores propuseram um mecanismo para inibir a adesão bacteriana e formação de biofilme entre uma superfície revestida com um material carregado negativamente e bactérias com superfície celular com carga semelhante (Trentin *et al.*, 2015). Diante dessas informações, pode ser compreendida a baixa formação de biofilme em lamínulas de vidro apresentada pelos isolados de *P. mirabilis* no presente estudo. Possivelmente, esse resultado deve-se a repulsão eletrostática, uma vez que essas bactérias apresentaram uma superfície celular hidrofílica e as lamínulas de vidro vistas pelo MEV são materiais hifrofílicos. Análises complementares serão realizadas substituindo o material de adesão celular para visualização de biofilme em MEV, já que os isolados investigados se apresentaram como potenciais formadores de biofilmes pelo método cristal violeta nos meios de cultura testados.

Os isolados também foram analisados molecularmente pela técnica de tipagem ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - PCR). As sequências ERIC são localizadas em regiões extragênicas do genoma bacteriano e têm sido utilizadas para a caracterização de bactérias por serem muito conservadas. O método de ERIC-PCR tem se mostrado satisfatório para tipagem de diferentes espécies bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e *Klebsiella Pneumoniae* (Khosravi *et al.*, 2016; Zhao e Dang, 2008; Seifi *et al.*, 2016). Nesse estudo, não foi possível diferenciar molecularmente os

isolados clínicos dos ambientais nem entre os isolados de um mesmo grupo havendo, portanto, duas possibilidades: contaminação do ambiente de estudo por bactérias de mesma origem, ou limitação da técnica utilizada para diferenciação de isolados de *P. mirabilis*.

Vale ressaltar que a técnica de ERIC-PRC em estudos anteriores de genotipagem da espécie *P. mirabilis* apresentou boa discriminação isolada ou em combinação com outros métodos (Michelim *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2014). Como alternativa, alguns autores sugerem a combinação de duas ou mais técnicas de tipagem molecular a fim de se obter resultados mais detalhados e discriminatórios sobre a diversidade genética das bactérias (Kumar *et al.*, 2014; Khosravi *et al.*, 2015). Contudo, *P. mirabilis* trata-se de um micro-organismo com particularidades metabólicas e genéticas relatadas na literatura, o que nos potencializa a compreender ainda mais a dinâmica de sobrevivência dessa bactéria.

Os diferentes perfis de resistência encontrados não garante a presença de clones bacterianos distintos entre os isolados investigados, uma vez que foi observado clonalidade entre os clínicos e ambientais. As bactérias hospitalares são mais expostas aos antibióticos e, comumente, adquirem diferentes genes de resistência às drogas rotineiramente utilizadas nos tratamentos clínicos. Entretanto, a formação de biofilme, revelada através do método do cristal violeta pelos isolados ambientais, pode ser um indicativo da necessidade de proteção a fatores adversos no meio em que vivem e, naturalmente, esse mecanismo de resistência favorece a seleção e disseminação de cepas resistentes no ambiente. Desse modo, a presença de enterobactérias no riacho Cavouco é um fator preocupante representando risco para a saúde pública.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro; a Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), ao Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) e ao Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (CB/UFPE) pelo espaço cedido.

Referências

Araújo MC e Oliveira MBM (2013) Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Rev. Ambient. Água. vol. 8: 3.

Batista N, Calvacante A, Medeiros C, Machado L, Evangelista R, Dias F, Santos E, Duarte A, R. Silva e Silva J (2016) Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. *Chemosphere*. 30: 34-141.

Baquero F, Lanza VF, Cantón R e Coque TM (2015) Public health evolutionary biology of antimicrobial resistance: priorities for intervention. *Evolutionary Applications*. 8: 223–239.

Cabral AB, Melo RCA, Maciel MAV e Lopes ACS (2012) Multidrug resistance genes, including *blaKPC* and *blaCTX-M-2*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. 45: 572-578.

CLSI (2015) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty–Five Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, document M100-S25 Wayne, PA.

Croxatto A, Prod'hom G e Greub G (2012) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 36: 380–407.

Czerwonka G, Guzy A, Kaluz K, Grosicka M, Danczuk M, Lechowicz L, Gmitter D, Kowalczyk P e Kaca W (2016) The role of *Proteus mirabilis* cell wall features in biofilm formation. *Arch Microbiol*.

Douterelo I, Husband S, Loza V e Boxall J (2016) Dynamics of Biofilm Regrowth in Drinking Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 82: 14.

Drzewiecka D (2016) Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microb Ecol*.

Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C e Gao J (2009) Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res*; 109:511-517.

Flemming HC e Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews / Microbiology*. 8.

Freitas JHES, Santana KV, Nascimento ACC, Paiva SC, Moura MC, Coelho LCBB, Oliveira MBM, Paiva PMG, Nascimento AE e Napoleão TH (2016) Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. *Chemosphere*. 163: 133-141.

Garcia-Alvarez L, Dawson S, Cookson B e Hawkey P (2012) Working across the veterinary and human health sectors. *J Antimicrob Chemother*. 67: 137–149.

Khosravi AD, Hoveizavi H, Mohammadian A, Farahani A e Jenabi A (2016) Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 31: 3.

Khosravi AD, Mehrabzadeh RS, Farahani A e Jamali H (2015) Molecular Identification of Clinical Isolates of *Mycobacterium fortuitum* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Polymerase Chain Reaction and ERIC PCR. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 9 12.

- Kumar A, Kumar A e Pratush A (2014) Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of *Bacillus* species. Springer Plus. 3: 312.
- Madsen JS, Burmolle M, Hansen LH e Sorensen SJ (2012) The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 65: 183-195.
- Michelim L, Muller G, Zacaria J, Delamare APL, Costa SOP e Echeverrigaray S (2008) Comparison of PCR-Based Molecular Markers for the Characterization of *Proteus mirabilis* Clinical Isolates. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 12: 423-429.
- Nazaret S e Aminov R (2014) Role and prevalence of antibiosis and the related resistance genes in the environment. Frontiers in Microbiology. 5: 520.
- Osińska A, Harnisz M e Korzeniewska E (2016) Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. Environ Sci Pollut Res. 23: 10818–10831.
- Park SY, Kang JH, Kim JHSB, Kim SK, Park YS e Seo (2012) Y Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak caused by patient transfer in 2 separate intensive care units. American Journal of Infection Control. 40: 565.
- Pavithra D e Doble M (2008) Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants--issues and prevention. Biomed. Mater. 3: 3.
- Poma V, Mamani N e Iñiguez V (2016) Impact of urban contamination of the La Paz River basin on thermotolerant coliform density and occurrence of multiple antibiotic resistant enteric pathogens in river water, irrigated soil and fresh vegetables. Springer Plus. 5: 499.
- Purificação-Júnior AF, Araújo LCA, Lopes ACS, Sobral MA, Lima GMS, Silva MV, Santos MTC e Oliveira MBM (2017) Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health. Afr. J. Microbiol. Res. Vol. 11(28), pp. 1142-1149.
- Santamaría J, López L e Soto CY (2011) Detection and diversity evaluation of tetracycline resistance genes in grassland-based production systems in Colombia, South America. Frontiers in Microbiology. 2: 252.
- Schaffer JN e Pearson MM (2015) *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. Microbiol Spectr. October, 3: 5.
- Sedláková MH, Urbánek K, Vojtová V, Suchánková H, Imwensi P e Kolář M (2014) Antibiotic consumption and its influence on the resistance in Enterobacteriaceae. BMC Research Notes. 7: 454.
- Seifi K, Kazemian H, Heidari H, Rezagholizadeh F, Saei Y, Shirvani F e Houri H (2016) Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. Jundishapur J Microbiol. 9.
- Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I e Ruzicka F. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical

recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Journal Compilation APMIS. 115: 891.

Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS e Shankar N (2004) Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 72: 6032–6039.

Trentin DS, Bonatto F, Zimmer FKR, Ribeiro VB, Antunes ALS, Barth AL, Soares GV, Krug CK, Baumvol IJR e Macedo AJ (2014) N₂/H₂ plasma surface modifications of polystyrene inhibit the adhesion of multidrug resistant bacteria. Surface & Coatings Technology. 245: 84–91.

Trentin DS, Giordani RB e Macedo AJ (2013) Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. Revista Liberato, Novo Hamburgo. 14: 113-238.

Trentin DS, Silva DB, Frasson AP, Rzhapishevska O, Silva MV, Pulcini EL, James G, Soares GV, Tasca T, Ramstedt M, Giordani RB, Lopes NP e Macedo AJ (2015) Natural Green Coating Inhibits Adhesion of Clinically Important Bacteria. Scientific Reports. 5: 8287.

Van Rossum T, Peabody MA, Uyaguari-Diaz MI, Cronin KI, Chan M, Slobodan JR, Nesbitt MJ, Suttle CA, Hsiao WWL, Tang PKC, Prystajecy NA e Brinkman FSL (2015) Year-Long Metagenomic Study of River Microbiomes Across Land Use and Water Quality. Frontiers in Microbiology. 6: 1405.

Von Wintersdorff H, Penders J, Van Niekerk M, Mills D, Majumder S, Van Alphen B, Savelkoul M e Wolffs G (2016) Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Frontiers in Microbiology. 7: 173.

Wang Y, Lee YSM e Dykes G (2014) The physicochemical process of bacterial attachment to abiotic surfaces: Challenges for mechanistic studies, predictability and the development of control strategies. Crit Rev Microbiol. 1-13.

Wattal C, Oberoi JK, Goel N, Raveendran R e Khanna S (2016) Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.

Wei Q, Hu Q, Li S, Lu H, Chen G, Shen B, Zhang P, Zhou Y (2014) A novel functional class 2 integron in clinical *Proteus mirabilis* isolates. J Antimicrob Chemother. 69: 973–976.

Zhao J e Dang H (2012) Coastal Seawater Bacteria Harbor a Large Reservoir of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in Jiaozhou Bay, China. Microb Ecol. 64: 187–199.

5 CONCLUSÃO

- Todos os isolados bacterianos estudados foram confirmados pela técnica de MALDI-TOF-MS como *Proteus mirabilis* com alto nível de compatibilidade.
- Diferentes perfis de resistência foram observados entre os isolados clínicos e ambientais, sendo que os isolados clínicos apresentaram maior perfil de resistência.
- Entre os isolados estudados, três ambientais, apresentaram superfície celular moderadamente hidrofóbica e, os demais, hidrofílica.
- Todos os isolados, se mostraram produtores de biofilme pelo método do cristal violeta com maior intensidade para os isolados ambientais. Neste estudo, não foi possível observar a formação de biofilme por MEV devido ao material utilizado para a adesão bacteriana.
- O biofilme dos isolados ambientes foi erradicado em mais de 50% para todos os antimicrobianos testados. Enquanto que, entre os isolados clínicos, parte dos antimicrobianos foi capaz de erradicar a formação de biofilme ($\geq 50\%$).
- Os diferentes perfis de resistência encontrados não garante a presença de clones bacterianos distintos entre os isolados investigados, uma vez que foi observado clonalidade entre os clínicos e ambientais. No entanto, a presença de enterobactérias potencialmente produtoras de biofilme no riacho Cavouco é preocupante para a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. J. L. R.; SILVA, S. M.; NAPOLEÃO, T. H.; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, M. B. M. Biofilm Formation in *Bacillus cereus*, *B. licheniformis* and *B. pumilus*: An Alternative for Survival in Impacted Environments. **International Journal of Sciences**. V. 6 – September (09), 2017.
- ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. 33 (10):692–699, 2015.
- ANVISA. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. NOTA TÉCNICA Nº 01/2013. Brasília, 17 de abril de 2013.
- ARAÚJO, L. C. A.; SILVA, S. M.; SILVA, V. S.; OLIVEIRA, M. B. M. susceptibilidade a antimicrobianos e formação de biofilme em *Escherichia coli* isoladas de um riacho urbano – Recife/PE-Brasil. In: Educação Ambiental & Biogeografia.1 ed. Ituiutaba: Barlavento, 2016, v.II, p. 1751-1760.
- ARAÚJO, M. C.; OLIVEIRA, M. B. M. Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. **Rev. Ambient. Água**. vol. 8: 3, 2013.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nat Rev Microbiol**. 10(11): 743–754, 2012.
- ARMBRUSTER, C. E.; SMITH, S. N.; YEP, A.; MOBLEY, H. L. T. Increased Incidence of Urolithiasis and Bacteremia During *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* Coinfection Due to Synergistic Induction of Urease Activity. **Journal of Infectious Diseases**. 209:1524–32, 2014.
- ARMBRUSTER, C. E.; HODGES, S.A.; MOBLEY, H. L. T. Initiation of Swarming Motility by *Proteus mirabilis* Occurs in Response to Specific Cues Present in Urine and Requires Excess L-Glutamine. **Journal of Bacteriology**. p. 1305–1319, V. 195:6, 2013.
- ASSIS, C. R.; ARAÚJO, M. C.; ARAUJO, A. V.; MARCEL, F.; MEDEIROS, A. C.; BEZERRA, R.; BEZERRA JUNIOR, L. **Riacho Cavouco: que Riacho é Esse?** 1 ed. Recife: Editora Universitária, 2014, v., p. 33-50.
- AVANZI, I. R.; GRACIOSO, L. H.; BALTAZAR, M. P. G.; KAROLSKI, B.; PERPETUO, E. A.; NASCIMENTO, C. A. O. Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. **Environ Sci Pollut Res**, 2016.
- BATISTA, N. J.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; MEDEIROS, E. C.; MACHADO, J. L.; EVANGELISTA, S. R.; DIAS, J. F.; DOS SANTOS, C. E.; DUARTE, A.; SILVA, F. R.; SILVA, J. Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. **Chemosphere**. 30;164:134-141, 2016.
- BAQUERO, F.; LANZA, V. F.; CANTÓN, R.; COQUE, T. M. Public health evolutionary biology of antimicrobial resistance: priorities for intervention. **Evolutionary Applications**. John Wiley & Sons Ltd 8;223–239, 2015.

BAQUERO, F.; TEDIM, A. P.; COQUE, T. M. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. **Frontiers in Microbiology**. Volume 4:15, 2013.

BEDENIC, B.; FIRIS, N.; ELVEI-GASPAROVIC, V.; KRILANOVIC, M.; MATANOVIC, K.; STIMAC, I.; LUXNER, J.; VRANES, J.; MESTROVIC, T.; ZARFEL, G.; GRISOLD, A. Emergence of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* in a long-term care facility in Croatia. **Wien Klin Wochenschr**. 128:404–413, 2016.

BEZERRA FILHO, C. M.; FRANCA, C. T.; OLIVEIRA, M. B.M. Compliance to biosafety standards of the principal laboratories generating chemical waste of the Pharmaceutical Department of UFPE. **Int. J. Pharm. Med. & Bio. Sc.**, 2014.

BRADSHAW, J. K.; SNYDER, B. J.; OLADEINDE, A.; SPIDLE, D.; BERRANG, M. E.; MEINERSMANN, R. J.; OAKLEY, B.; SIDLE, R. C.; SULLIVAN, K.; MOLINA, M. Characterizing relationships among fecal indicator bacteria, microbial source tracking markers, and associated waterborne pathogen occurrence in stream water and sediments in a mixed land use watershed. **Water Research**. 101:498-509, 2016.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução 467/2015, critérios para a autorização de uso de produtos ou de agentes de processos físicos, químicos ou biológicos. **Diário Oficial da União**, nº 135. Seção 1 p. 70-71, 17 de julho 2015.

CABRAL, A. B.; MACIEL, M. A. V.; BARROS, J. F.; ANTUNES, M. M.; LOPES, A. C. S. Detection of *bla*KPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop**. 48 (1): 94-95, 2015.

CAHOON, L. B.; HALES, J. C.; CAREY, E. S.; LOUCAIDES, S.; ROWLAND, K. R.; TOOTHMAN, B. R. Multiple modes of water quality impairment by fecal contamination in a rapidly developing coastal area: southwest Brunswick County, North Carolina. **Environ Monit Assess**. 188: 89, 2016.

CALBO, E.; ÁLVAREZ-ROCHA, L.; GUDIOLD, F.; PASQUAU, J. A review of the factors influencing antimicrobial prescribing. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. 31. 12-15, 2013.

CHAVES, T. P.; FERNANDES, F. H. A.; SANTANA, C. P.; SANTOS, J. S.; MEDEIROS, F. D.; FELISMINO, D. C.; SANTOS, V. L.; CATÃO, R. M. R.; COUTINHO, H. D. M.; MEDEIROS, A. C. D. Evaluation of the Interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz Extract and Antimicrobials Using Biological and Analytical Models. **Plos One**, 2016.

CHOUDURI, A. U.; WADUD, A. Strong cephalosporin resistant uropathogen, *Proteus mirabilis*, in urban tap water harbors a risk to public health, Bangladesh. **Glo. Adv. Res. J. Microbiol**. Vol. 2(10) pp. 164-171, 2013.

CHOUDURI, A. U.; WADUD, A. Twitching Motility, Biofilm Communities in Cephalosporin Resistant *Proteus* spp and the Best in vitro Amoxicillin Susceptibility to Isolates. **American Journal of Microbiological Research**. Vol. 2, No. 1, 8-15, 2014.

COATES, A.; HALLS, G.; YANMIN HU, Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? **British Journal of Pharmacology**. 163. 184–194, 2011.

COHEN, R.; BABUSHKIN, F.; SHIMONI, Z.; COHEN, S.; LITIG, E.; SHAPIRO, M.; ADLER, A.; PAIKIN, S. Water faucets as a source of *Pseudomonas aeruginosa* infection and colonization in neonatal and adult intensive care unit patients. **American Journal of Infection Control**, 2016.

CROUCHER, N. J.; MOSTOWY, R.; WYMANT, C.; TURNER, P.; BENTLEY, S. D.; FRASER, C. Horizontal DNA Transfer Mechanisms of Bacteria as Weapons of Intragenomic Conflict. **PLOS Biology**. 14(3): March 2, 2016.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol Ver.** 36. 380–407, 2012.

CZERWONKA, G.; GUZY, A.; KAŁUZ, K.; GROSICKA, M.; DANCZUK, M.; LECHOWICZ, L.; GMITER, D.; KOWALCZYK, P.; KACA, W. The role of *Proteus mirabilis* cell wall features in biofilm formation. **Arch Microbiol**, 2016.

DI CESARE, A.; ECKERT, E. M.; D'URSO, S.; BERTONI, R.; GILLAN, D. C.; WATTIEZ, R.; CORNO, G. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. **Water Research** 94. 208-214, 2016.

DODD, M. C. Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. **J. Environ. Monit.** 14 - 1754, 2012.

DRZEWIECKA, D. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. **Microb Ecol**, 2016.

ESPINDULA, J. C.; SANTOS, A. C. Características hidrogeológicas e vulnerabilidade do aquífero freático na área do cemitério da Várzea – Recife/PE. **Revista Águas Subterrâneas**, v. 28, n. 1, São Paulo, Brasil, 2014.

FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; DUQUE, Z.; ROJAS, H.; SUÁREZ, P.; CONTRERAS, M.; GARCÍA-AMADO, M. A.; ALCIATURI, C. Environmental scanning electron microscopy analysis of *Proteus mirabilis* biofilms grown on chitin and stainless steel. *Ann Microbiol.* 65: 1401–1409, 2015.

FERNANDES, R.; AMADOR, P.; PRUDÊNCIO, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**. 24:7–17, 2013.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews / Microbiology**. Volume 8, 2010.

FREITAS, J. H. E. S.; SANTANA, K. V.; NASCIMENTO, A. C. C.; PAIVA, S. C.; MOURA, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; OLIVEIRA, M. B. M.; PAIVA, P. M. G.; NASCIMENTO, A. E.; NAPOLEÃO, T. H. Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**. 163; 133-141, 2016.

GARCIA-ALVAREZ, L.; DAWSON, S.; COOKSON, B.; HAWKEY, P. Working across the veterinary and human health sectors. **J Antimicrob Chemother.** 67 Suppl 1: 137–149, 2012.

GARDEA, C. D.; GUERRA, P. T.; FLORES, R. G.; SERNA, F. J. Z. D.; VEJA, G. E.; MOORILLÓN, G. V. N.; RECODER, M. C. P.; RAMÍREZ, B. S.; HORTA, M. C. G.; RAMÍREZ, R. I. Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Surface Water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. 13: 597, 2016.

GIOWANELLA, M.; BOZZA, A.; DALZOTO, P. R.; DIONÍSIO, J. A.; ANDRAUS, S.; GUIMARÃES, E. L. G.; PIMENTEL, I. C. Microbiological quality of water from the rivers of Curitiba, Paraná State, Brazil, and the susceptibility to antimicrobial drugs and pathogenicity of *Escherichia coli*. **Environ Monit Assess**. 87: 673, 2015.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**. Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.

HAHN, A. B. B.; BAHLIS, M.; BASSO, A. P.; SAND, S. T. V. D. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em micro-organismos isolados do Rio dos Sinos, RS, Brasil. **R. bras. Bioci.** Porto Alegre, v. 13, n. 3, p. 155-164, 2015.

HOLLING, N.; LEDNOR, D.; TSANG, S.; BISSELL, A.; CAMPBELL, L.; NZAKIZWANAYO, J.; DEDI, C.; HAWTHORNE, J. A.; HANLON, G.; OGILVIE, L. A.; SALVAGE, J. P.; PATEL, B. A.; BARNES, L. M.; JONES, B. V. Elucidating the Genetic Basis of Crystalline Biofilm Formation in *Proteus mirabilis*. **Infection and Immunity**. p. 1616–1626, V. 82: 4, 2014.

HOLLING, N.; DEDI, C.; JONES, C. E.; HAWTHORNE, J. A.; HANLON, G. W.; SALVAGE, J. P.; PATEL, B. A.; BARNES, L. M.; JONES, B. V. Evaluation of environmental scanning electron microscopy for analysis of *Proteus mirabilis* crystalline biofilms in situ on urinary catheters. **FEMS Microbiol. Lett.** 355; 20–27, 2014.

HULTON, C. S.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Mol microbiol**. 5(4): 825-34, 1991.

HU, Y. Y.; CAI, J. C.; ZHANG, R.; ZHOU, H. W.; SUN, Q.; CHEN, G. X. Emergence of *Proteus mirabilis* Harboring *bla*_{KPC-2} and *qnrD* in a Chinese Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 2278–2282, 2012.

JACOBSEN, S. M.; SHIRTLIFF, M. E. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. **Virulence**. 2:5, 460-465, 2011.

JORDAN, R. P. C.; MALIC, S.; WATERS, M. G.; STICKLER, D. J.; WILLIAMS, D. W. Development of an antimicrobial urinary catheter to inhibit urinary catheter encrustation. **Microbiology Discovery**. 3; 1, 2015.

JUTKINA, J.; RUTGERSSON, C.; FLACH, C. F.; LARSSON, D. G. An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance. **Science of the Total Environment** 548–549, 2016.

KHOSRAVI, A. D.; MEHRABZADEH, R. S.; FARAHANI, A.; JAMALI, H. Molecular Identification of Clinical Isolates of *Mycobacterium fortuitum* by Random Amplified

Polymorphic DNA (RAPD) Polymerase Chain Reaction and ERIC PCR. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. Vol-9(12): DC01-DC05, 2015.

KHOSRAVI, A. D.; HOVEIZAVI, H.; MOHAMMADIAN, A.; FARAHANI, A.; JENABI, A. Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR. **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol. 31 (3), 2016.

KOBAYASHI, J. Search for New Bioactive Marine Natural Products and Application to Drug Development. **Chem. Pharm. Bull.** 64, 1079–1083, 2016.

KOTTWITZ, L. B.M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Methods of phenotypic and genotypic characterization of Salmonella Enteritidis and the usefulness of PFGE technique in epidemiologic studies. **Biosaúde**, v. 13, n. 1 / 2, 2011.

KRAGH, K. N.; HUTCHISON, J. B.; MELAUGH, G.; RODESNEY, C.; ROBERTS, A. E. L.; IRIE, Y.; JENSEN, P. O.; DIGGLE, S. P.; ALLEN, R. J.; GORDON, V.; BJARNSHOLT, T. Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. **American Society For Microbiology – mBio**. Vol. 7, 2016.

KUMAR, A.; KUMAR, A.; PRATUSH, A. Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of *Bacillus* species. **Springer Plus**. 3: 312, 2014.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General Principles of Antimicrobial Therapy. **Mayo Clin Proc.** 86 (2):156-167, 2011.

LIU, T.; WEIWEN W.; CHEN, N.; ZHU, J.; WANG, J.; HE, X.; JIN, Y. Bacterial characterization of Beijing drinking water by flow cytometry and MiSeq sequencing of the 16S rRNA gene. **Ecology and Evolution**. 6(4): 923–934, 2016.

LIU, Y. H.; YAMAZAKI, W.; HUANG, Y. T.; LIAO, C. H.; SHENG, W. H.; HSUEH, P. R. Clinical microbiological characteristics of patients with bacteremia caused by *Campylobacter* species with an emphasis on the subspecies of *C. fetus*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. xx,1-10, 2017.

MABOU, F. D.; TAMOKOU, J. D.; NGNOKAM, D.; NAZABADIOKO, L. V.; KUIATE, J. R.; BAG, P. K. Complex secondary metabolites from *Ludwigia leptocarpa* with potent antibacterial and antioxidant activities. **Drug Discoveries & Therapeutics**. 10 (3): 141-149, 2016.

MADSEN, J. S.; BURMOLLE M.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, p. 183-195, 2012.

MAILHAC, A.; DURAND, H.; BOISSET, S.; MAUBON, D.; BERGER, F.; MAURIN, M.; CHIQUET A, C.; BIDART, M. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid diagnosis of postoperative endophthalmitis. **Journal of Proteomics**. 152. 150–152, 2017.

MARTINEZ, J. L.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. **Nature Reviews | Microbiology**. Vol. 13, 2015.

MELO, L. D. R.; VEIGA, P.; CERCA, N.; KROPINSKI, A. M.; ALMEIDA, C.; AZEREDO, J.; SILLANKORVA, S. Development of a Phage Cocktail to Control *Proteus mirabilis* Catheter-associated Urinary Tract Infections. *Frontiers in Microbiology*. V. 7: 1024, 2016.

MICHALSKA, A. D.; SACHA, P. T.; KACZYŃSKA, K.; TRYNISZEWSKA, E. A. The diversity of aminoglycoside-modifying enzymes among ESBL - positive *Proteus mirabilis* clinical strains. **MEDtube Science**. Vol.II (4), 2014.

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biology**. Volume 5 (11): 307, 2007.

MORGENSTEIN, R. M.; SZOSTEK, B.; RATHER, P. N. Regulation of gene expression. During swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. **FEMS Microbiol.** 34; 753–763, 2010.

NASCIMENTO, E. D.; MAIA, C. M. M.; ARAÚJO, M. F. F. Contaminação da água de reservatórios do semiárido potiguar por bactérias de importância médica. **Rev. Ambient. Água**. vol. 11 n. 2 Taubaté – Apr. / Jun. 2016.

NAZARET, S.; AMINOV, R. Role and prevalence of antibiosis and the related resistance genes in the environment. **Frontiers in Microbiology**. V. 5: 520, 2014.

NICKZAD, A.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Quorum Sensing Controls Swarming Motility of *Burkholderia glumae* through Regulation of Rhamnolipids. **PLoS One**. 10(6), 2015.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm. **Trends in molecular medicine**. V. 18, n. 5, p. 263-72, 2012.

NOWAKIEWICZ, A.; ZIOAOKOWSKA, G.; ZIEBA, P.; GNAT, S.; TROSCIANCZYK, A.; ADASZEK, E. Characterization of Multidrug Resistant *E. faecalis* Strains from Pigs of Local Origin by ADSRRS-Fingerprinting and MALDI-TOF-MS; Evaluation of the Compatibility of Methods Employed for Multidrug Resistance Analysis. **Plos One**. 30, 2017.

OSINSKA, A.; HARNISZ, M.; KORZENIEWSKA, E. Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. **Environ Sci Pollut Res**. 23:10818–10831, 2016.

PARK, S. Y.; KANG, J. H.; KIM, J. H.; KIM, S. B.; KIM, S. K.; PARK, Y. S.; SEO, Y. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak caused by patient transfer in 2 separate intensive care units. **American Journal of Infection Control**. 40 (6): 565-7, 2012.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Einstein*. 10 (1):118-9, 2012.

PELLEGRINO, R.; SCAVONE, P.; UMPIÉRREZ, A.; MASKELL, D. J.; ZUNINO, P. *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. **Pathogens and Disease**. 67, 104–107, 2013.

POMA, V.; MAMANI, N.; IÑIGUEZ, V. Impact of urban contamination of the La Paz River basin on thermotolerant coliform density and occurrence of multiple antibiotic resistant

enteric pathogens in river water, irrigated soil and fresh vegetables. **Springer Plus**. 5:499, 2016.

POONIA, S.; SINGH, T. S.; TSERING, D. C. Antibiotic Susceptibility Profile of Bacteria Isolated from Natural Sources of Water from Rural Areas of East Sikkim. **Indian J Community Med**. 39(3): 156–160, 2014.

PURIFICAÇÃO-JÚNIOR, A. F.; ARAÚJO, L. C. A.; LOPES, A. C. S.; SOBRAL, M. A.; LIMA, G. M. S.; SILVA, M. V.; SANTOS, M.T.C.; OLIVEIRA, M.B.M. Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health. *Afr. J. Microbiol. Res.* Vol. 11(28), pp. 1142-1149, 2017.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSEMBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microb. Letts**. v. 9, p. 29-33, 1980.

SANTOS, A. F.; CAYÔ, R.; SCHANDERT, L.; GALES, A. C. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. **J Bras Patol Med Lab**, v. 49, n. 3, p. 191-197, 2013.

SARASWATHI, R.; SUMITHRA, P.; SIVAKAMI, R. Identification of Enterobacteriaceae studies in Carps during rearing a fresh water pond. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**. 4(12): 661-669, 2015.

SAUGET, M.; VALOT, B.; BERTRAND, X.; HOCQUET, D. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria? **Trends in Microbiology**, 2016.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. **Microbiol Spectr**. October; 3(5), 2015.

SCOPEL, M.; ABRAHAM, W. R.; HENRIQUES, A. T.; MACEDO, A. J. Dipeptide *cis-cyclo*(Leucyl-Tyrosyl) produced by sponge associated *Penicillium* sp. F37 inhibits biofilm formation of the pathogenic *Staphylococcus epidermidis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Vol. 23; p. 624-626, 2013.

SEDLAKOVA, M. H.; URBANEK, K.; VOJTOVA, V.; SUCHANKOVA, H.; IMWENSI, P.; KOLAR, M. Antibiotic consumption and its influence on the resistance in Enterobacteriaceae. **BMC Research Notes**. 7: 454, 2014.

SEIFI, K.; KAZEMIAN, H.; HEIDARI, H.; REZAGHOLIZADEH, F.; SAEED, Y.; SHIRVANI, F.; HOURI, H. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. **Jundishapur J Microbiol**. 9 (1): 30682, 2016.

SNYDER, G.M.; O’FALLON, E.; D’AGATA, E.M.C. Co-colonization with multiple different species of multidrug-resistant Gram negative bacteria. **Am. J. Infect. Control**. p.1-5, 2011.

STANKOWSKA, D.; CZERWONKA, G.; ROZALSKA, S.; GROSICKA, M.; DZIADEK, J.; KACA, W. Influence of quorum sensing signal molecules on biofilm formation in *Proteus mirabilis* O18. **Folia Microbiol**. 57: 53–60, 2012.

TALBOT, G. H. Beta-lactam antimicrobials: what have you done for me lately? *Annals of the New York, Academy of Sciences*. V.1277, pp. 76-83, 2013.

TAHRANI, L.; SOUFI, L.; MEHRI, I.; NAJJARI, A.; HASSAN, A.; LOCO, J. V.; REYNS, T.; CHERIF, A.; MANSOUR, H. B. Isolation and characterization of antibiotic-resistant bacteria from pharmaceutical industrial wastewaters. *Microbial Pathogenesis*. 89: 54-61, 2015.

TEMPLAR, H. A.; DILA, D. K.; BOOTSMA, M. J.; CORSI, S. R.; MCLELLAN, S. L. Quantification of human-associated fecal indicators reveal sewage from urban watersheds as a source of pollution to Lake Michigan. *Water Research*. 100: 556-567, 2016.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

TUSON, H. H.; COPELAND, M. F.; CAREY, S.; SACOTTE, R.; WEIBELA, D. B. Flagellum Density Regulates *Proteus mirabilis* Swarmer Cell Motility in Viscous Environments. *Journal of Bacteriology*. p. 368–377. V. 195, 2013.

VAN ROSSUM, T.; PEABODY, M. A.; UYAGUARI-DIAZ, M. I.; CRONIN, K. I.; CHAN, M.; SLOBODAN, J. R.; NESBITT, M. J.; SUTTLE, C. A.; HSIAO, W. W. L.; TANG, P. K. C.; PRYSTAJECKY, N. A.; BRINKMAN, F. S. L. Year-Long Metagenomic Study of River Microbiomes Across Land Use and Water Quality. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 6: 1405, 2015.

VARELA, A. R.; ANDRE, S.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system. *Water Res.* 54: 327-336, 2014.

VON WINTERSDORFF, C. J. H.; PENDERS, J.; VAN NIEKERK, J. M.; MILLS, N. D.; MAJUMDER, S.; VAN ALPHEN, L. B.; SAVELKOUL, P. H. M.; WOLFFS, P. F. G. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*. V. 7: 173, 2016.

Wang Y, Lee SM, Dykes G. The physicochemical process of bacterial attachment to abiotic surfaces: Challenges for mechanistic studies, predictability and the development of control strategies. *Crit Rev Microbiol*. 1-13, 2014.

WATTAL, C.; OBEROI, J. K.; GOEL, N.; RAVEENDRAN, R.; KHANNA, S. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016.

WEI, Q.; HU, Q.; LI, S.; LU, H.; CHEN, G.; SHEN, B.; ZHANG, P.; ZHOU, Y. A novel functional class 2 integron in clinical *Proteus mirabilis* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 69: 973–976, 2014.

WHO. Sanitation safety planning: manual for safe use and disposal of wastewater, greywater and excreta. *World Health Organization*, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, 2016.

WRAY, S. K.; HULL, S. I.; COOK, R. G.; BARRISH, J.; HULL, R. A. Identification and Characterization of a Uroepithelial Cell Adhesin from a Uropathogenic Isolate of *Proteus mirabilis*. **Infection and Immunity**. 43-49, 1986.

XU, X.; CHENG, J.; WU, Q.; ZHANG, J.; XIE, T. Prevalence, characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail aquatic products in North China. **BMC Microbiology**. 16:32, 2016.

ZANKARI, E.; HASMAN, H.; COSENTINO, S.; VESTERGAARD, M.; RASMUSSEN, S.; LUND, O.; AARESTRUP, F. M.; LARSEN, M. V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother**. 67: 2640–2644, 2012.

ZOTHANPUIA; PASSARI, A. K.; GUPTA, V. K.; SINGH, B. P. Detection of antibiotic-resistant bacteria endowed with antimicrobial activity from a freshwater lake and their phylogenetic affiliation. **PeerJ**, 2016.