



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS - CB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LÍVIA CAROLINE ALEXANDRE DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA MICROBIOTA DO
RIACHO CAVOUÇO –UFPE, *CAMPUS* RECIFE**

RECIFE

2018

LÍVIA CAROLINE ALEXANDRE DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA MICROBIOTA DO
RIACHO CAVOUÇO –UFPE, *CAMPUS* RECIFE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Luiza Vilela Oliva

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

RECIFE

2018

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Araújo, Livia Caroline Alexandre de
Caracterização fenotípica e molecular da microbiota do Riacho Cavouco – UFPE,
Campus Recife/Livia Caroline Alexandre de Araújo. – 2018.

97 f. : il.

Orientadora: Maria Luiza Vilela Oliva.

Coorientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas,
Recife, 2017.

Inclui referências e apêndices.

1. Água – Poluição. 2. Ecologia aquática. 3. Genética ecológica. I.
Vilela, Maria Luiza Oliva (orientadora) II. Oliveira, Maria Betânia Melo
de (coorientadora) III. Título.

577.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-007

LÍVIA CAROLINE ALEXANDRE DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA MICROBIOTA DO
RIACHO CAVOUÇO –UFPE, *CAMPUS* RECIFE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Betânia Melo de Oliveira
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina Souza Lopes
Departamento de Medicina Tropical
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr^º. Túlio Diego da Silva
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Maria Guedes Paiva
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dedico à minha família:
Meus pais Kátia e Haroldo,
Meus irmãos Tatiane e Hugo,
E em especial, à minha filha Júlia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus que ao longo de toda minha jornada esteve sempre comigo guiando meus caminhos e me concedendo forças em todos os obstáculos, permitindo a realização de mais um sonho.

Aos meus pais e meus irmãos, pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida. Vocês são minha base.

À minha filha Júlia, por ser minha alegria, minha inspiração, meu amor. Por ela tudo isso faz sentido.

À Profa. Márcia Vanusa por ter acreditado em mim desde o mestrado, por toda disponibilidade, atenção e orientação durante todos esses anos.

À Profa. Tereza, por todo o apoio, orientação, paciência e por toda ajuda em todos os momentos em que precisei.

À Profa. Maria Luiza, oportunidade, confiança, sugestões e contribuições.

À Profa. Ana Catarina por toda disponibilidade, atenção e contribuições no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos Bruno, Priscilla e Hortência pela amizade, pelo apoio, por ter dividido todos os momentos de angústia e de alegria.

À todos os amigos que fiz no Laboratório de Biologia Molecular: Sivoneide, Barbara, Amanda, Tayane, Vitória e todos os outros que dividiram seu conhecimento e compartilharam o dia-a-dia no laboratório durante toda essa jornada.

À todos os outros amigos que sempre torceram para que eu conseguisse concluir mais essa etapa na minha vida.

À todos do CETENE e dos Laboratório de Parasitologia e de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães que auxiliaram em vários experimentos.

À Fundação de Amparo a Ciências e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE pelo suporte financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

E meu agradecimento especial vai para a Profa. Betânia, não só pela orientação e todo o conhecimento transferido, mas por toda a dedicação, paciência, apoio. Gostaria de expressar a minha admiração pela pessoa e pela profissional que ela é, a qual se tornou uma referência de amor e ética à profissão. Agradeço a Deus por tê-la colocado no meu caminho e serei eternamente grata por tudo. Muito obrigada, professora!

Obrigada a todos!

*"Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais."*

Augusto Cury

RESUMO

O riacho Cavouco corresponde a um riacho urbano que deságua em um dos principais rios do estado de Pernambuco, o rio Capibaribe. Esse riacho tem sua nascente no *Campus*- Recife da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e possui uma extensão de aproximadamente 6 Km. O presente estudo objetivou avaliar a qualidade da água e verificar a eficiência de diferentes técnicas para identificação microbiana nesse ambiente, além de comparar perfis fenotípicos e genéticos de isolados ambientais e clínicos de *Klebsiella pneumoniae* e avaliar o efeito do mercúrio (Hg^{+2}) na formação de biofilme. Foram realizadas coletas de água em cinco pontos estratégicos do riacho Cavouco e as espécies bacterianas foram identificadas usando métodos bioquímicos e moleculares. Para avaliar a qualidade da água foram quantificados os coliformes totais e termotolerantes. O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *K. pneumoniae* foi verificado por meio do método de difusão em disco. A resistência ao Hg^{+2} foi determinada pela concentração mínima inibitória (CMB) e pela presença do gene *merA*. A capacidade de formação de biofilme e sua resposta à presença e ausência do Hg^{2+} foram avaliadas utilizando os seguintes procedimentos: crescimento em Vermelho Agar Congo, método do Cristal de Violeta, análise de hidrofobicidade, presença dos genes *cps*, *fimH* e *mrkD*, e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Todas as amostras coletadas foram positivas para coliformes totais e termotolerantes indicando que o ambiente estudado encontra-se impactado. Em relação a caracterização da microbiota local foram identificados fenotípica e confirmados molecularmente 75 isolados bacterianos, pertencentes a 14 gêneros incluindo gram-positivos (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brachybacterium*, *Exiguobacterium*) e gram-negativos (*Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Brevundimonas*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Providencia*), os quais correspondem aos primeiros representantes da Bacterioteca de Ambientes Aquáticos Impactados da UFPE. As análises revelaram perfis distintos de resistência ao metal e antimicrobianos, bem como nas respostas as diferentes concentrações do metal na formação de biofilme, entre os isolados clínicos e ambientais de *K. pneumoniae*. Essa diversidade foi confirmada através da técnica ERIC-PCR que revelou perfis genéticos distintos dentro e entre os dois grupos investigados. Os resultados revelam a diversidade microbiana no riacho Cavouco por meio de técnicas moleculares e demonstra a eficiência da técnica MALDI-TOF-MS na identificação de isolados de ambientes aquáticos impactados. Os dados demonstram que o “Cavouco” encontra-se poluído, albergando e disseminando bactérias patogênicas sendo

necessário um constante monitoramento desse ecossistema visando a diminuição do impacto ambiental e a qualidade à saúde pública.

Palavras-chave: MALDI-TOF-MS. Gene *16s rRNA*. Metais pesados. Biofilme. Saúde Pública.

ABSTRACT

The Cavouco stream corresponds to an urban stream that flows into one of the main rivers of the state of Pernambuco, the Capibaribe river. This stream has its source in the Campus-Recife of the Federal University of Pernambuco (UFPE) and has an extension of approximately 6 km. The present study aimed to evaluate the water quality and verify the efficiency of different techniques for microbial identification in this environment, besides to compare phenotypic and genetic profiles of environmental and clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and to evaluate the effect of mercury (Hg^{+2}) on biofilm formation. Water samples were collected at five strategic points of the Cavouco stream and bacterial species were identified using biochemical and molecular methods. To evaluate the water quality, total and thermotolerant coliforms were quantified. The antimicrobial susceptibility profile of the *K. pneumoniae* isolates was verified by the disc diffusion method. Resistance to Hg^{+2} was determined by the minimal inhibitory concentration (MIC) and the presence of the *merA* gene. The ability of biofilm formation and its response to the presence and absence of Hg^{+2} were evaluated using the following procedures: growth in Congo Red Agar, Violet Crystal method, hydrophobicity analysis, presence of *cps*, *fimH* and *mrkD* genes, and scanning electron microscopy (SEM). All collected samples were positive for total and thermotolerant coliforms indicating that the studied environment was impacted. Seventy-five bacterial isolates belonging to 14 genera including Gram-positive (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brachy bacterium*, *Exiguobacterium*) and Gram-negative (*Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Brevundiomonas*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Providencia*), which correspond to the first representatives of the Bacterioteca of Aquatic Environments Impacted of the UFPE. The analyzes revealed distinct profiles of metal and antimicrobial resistance as well as responses to different metal concentrations in biofilm formation between the clinical and environmental isolates of *K. pneumoniae*. This diversity was confirmed by the ERIC-PCR technique that revealed distinct genetic profiles within and between the two groups investigated. The results reveal the microbial diversity in the Cavouco stream by means of molecular techniques and demonstrate the efficiency of the MALDI-TOF-MS technique in the identification of isolated aquatic environments. The data demonstrates that the "Cavouco" is polluted, harboring and disseminating pathogenic bacteria and it is necessary a constant monitoring of this ecosystem aiming at the reduction of the environmental impact and the quality to the public health.

Keywords: MALDI-TOF-MS. *16s rRNA* gene. Heavy Metals. Biofilm. Public Health.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 - Representação das etapas da adesão e formação de biofilme bacteriano.....24

Figura 2 - Representação esquemática das etapas de análise por MALDI-TOF-MS..
.....27

Figura 3 - Localização do riacho Cavouco no estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil.....29

ARTIGO 1

Figure 1 - Representation of Cavouco creek area, showing the five collection points (P1-P5) and microbial representatives.....33

Figure 2 - Similarity dendrogram generated from the comparison between the sequences of 16S rRNA strains from collection points at Cavouco and the deposited ones in GenBank database.....35

ARTIGO 2

Figure 1 - Biofilm formation in the presence of mercury by reference (UFPEDA396), environmental (F2P2A, F1P3C, F2P3C, F2P3A, and F2P4A), and clinical (K5-A2 and K36-A2) isolates of *K. pneumoniae*. C: Control (absence of metal). # $p < 0.05$ compared to control.....42

Figure 2 - Scanning electron microscopy image of biofilm formed in the presence and absence of mercury (Hg^{2+}) by isolates of *K. pneumoniae*. A – UFPEDA396 in absence of mercury (control); B - UFPEDA396 exposed to mercury at 6.25 $\mu g/mL$. C – F2P3A control; D – F2P3A exposed to mercury at 12.5 $\mu g/mL$; E – K36-A2 control; F – K36-A2 exposed to mercury at 25.0 $\mu g/mL$43

Figure 3 - Genetic diversity of *K. pneumoniae* isolated by ERIC-PCR. (A) Electrophoresis of PCR products. (B) Dendrogram of similarity generated by the NTSYS 2.0 software. M: Molecular marker; 1: F1P3C; 2: F2P3A; 3: F2P4A; 4: F2P2A; 5: F2P3C; 6: UFPEDA396; 7: K36-A2; 8: K5-A2.....44

ARTIGO 3

Figura 1 - Análise comparativa de métodos moleculares (MALDI-TOF-MS e sequenciamento do gene *16S rRNA*) na identificação e distribuição de isolados bacterianos em um ambiente aquático impactado.....68

Figura 2 - Dendograma gerado a partir das sequências do gene *16S rRNA* de isolados bacterianos obtidos do riacho Cavou e sequencias referências depositadas no GenBank.....69

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1 - Exemplos de características estruturais e funcionais compartilhadas em mecanismos de resistência a metais e antibióticos.....	22
---	----

ARTIGO 1

Table 1 - Phenotypic and molecular identification of isolated bacteria from Cavouco stream collection points.....	34
--	----

ARTIGO 2

Table 1- Primers used for PCR and DNA sequencing.....	40
Table 2 - Characterization of the bacterial isolates: identification by MALDI-TOF-MS, antibiotic resistance profiles, biofilm formation ability, minimal inhibitory concentration (MIC) of mercury (Hg ²⁺), hydrophobicity profile, and the presence of virulence genes and of mercury.....	41

ARTIGO 3

Tabela 1 - Características morfológicas de isolados bacterianos obtidos de um riacho urbano impactado em Pernambuco, Brasil.....	65
Tabela 2 - Caracterização molecular (MALDI-TOF-MS e sequenciamento do gene <i>16S rRNA</i>) de isolados bacterianos obtidos de um riacho urbano impactado em Pernambuco, Brasil.....	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo Geral.....	16
1.1.2 Objetivos Específicos.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 AMBIENTE AQUÁTICO IMPACTADO.....	17
2.2 MICROGANISMOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS IMPACTADOS.....	17
2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS METAIS PESADOS.....	19
2.3.1 Características Gerais do Mercúrio.....	20
2.4. RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS.....	21
2.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
2.6 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BIOFILMES.....	24
2.7 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA.....	25
2.7.1 Gene <i>16S rRNA</i>	26
2.7.2 Características Gerais do MALDI-TOF-MS.....	27
2.8 TIPAGEM MOLECULAR DE MICRORGANISMOS.....	28
2.9 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO RIACHO CAVOUÇO.....	29
3 RESULTADOS.....	31
3.1 MICROBIOTA SAMPLES FROM A POLLUTED STREAM IN RECIFE-PE, BRAZIL AND IMPORTANCE TO PUBLIC HEALTH.....	31
3.2 <i>IN VITRO</i> EVALUATION OF MERCURY (HG ²⁺) EFFECTS ON BIOFILM FORMATION BY CLINICAL AND ENVIRONMENTAL ISOLATES OF <i>Klebsiella pneumonia</i>	38
3.3 APLICABILIDADE DE TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA EM UM RIACHO URBANO IMPACTADO.....	47
4 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE A: Capítulo de livro 1: Susceptibilidade a antimicrobianos e formação de biofilme em <i>Escherichia coli</i> isoladas de um riacho urbano – Recife/PE.....	82
APÊNDICE B: Capítulo de Livro 2: Ecossistema Aquático Impactado: Um ambiente propício a disseminação de bactérias patogênicas.....	88

1 INTRODUÇÃO

O ambiente aquático é altamente complexo e diversificado, compreendendo vários tipos de ecossistemas que são produtos dinâmicos de interações complexas entre componentes bióticos e abióticos característicos de cada um deles. Alterações nas propriedades físicas e químicas desses ecossistemas podem afetar significativamente o equilíbrio das formas de vida ali presentes (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995; ZHANG; ZHANG; FANG, 2009).

Nas últimas décadas esses ecossistemas têm sido alterados de maneira significativa em função de múltiplos impactos ambientais advindos do lançamento de grandes quantidades de efluentes sem tratamento prévio adequado, resultando na escassez dos recursos naturais ainda existentes (FREITAS, et al., 2011; FAGUNDES, 2009). Dentre os principais poluentes que desencadeiam impactos negativos às formas de vida destacam-se os metais pesados. A presença desses contaminantes pode causar modificações na estrutura e na função das comunidades microbianas (DIXIT et al., 2015), as quais podem desenvolver vários mecanismos de resistência que possibilitem sua sobrevivência (ADARSH et al., 2007). Além disso, a resistência a metais pesados pode contribuir para a evolução de genes de resistência aos diferentes tipos de antimicrobianos devido ao aumento da pressão seletiva no ambiente (SARMA et al., 2010).

Dentre os metais tóxicos mais prevalentes no ambiente, destaca-se o mercúrio (Hg^{+2}). Esse metal pode ser emitido por inúmeras fontes naturais e antropogênica e, por ser recalcitrante à biodegradação frequentemente ele persiste no meio (JAN et al., 2009; BARKAY et al., 2005). Bactérias resistentes ao mercúrio têm sido encontradas em diferentes ambientes incluindo solos (MAHBUB et al., 2017), sedimentos (WU et al., 2016), água (JAN et al., 2016) e, recentemente em amostras clínicas (PÉREZ-VALDESPINO et al., 2013; YANG et al., 2018).

A capacidade de adaptação, bem como as diferenças metabólicas e fisiológicas são características essenciais para que microorganismos permaneçam nesses locais. Um dos mecanismos adaptativos presentes em bactérias que vem sendo frequentemente investigado é a formação de biofilme (CHOUDURI; WADUD, 2014). Biofilmes são estruturas compostas principalmente de células microbianas e de uma matriz formada por um aglomerado de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (TRENTIN et al., 2013). Células crescidas em biofilme apresentam algumas propriedades distintas das células planctônicas, uma delas é a resistência aumentada aos antimicrobianos e metais pesados (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Diante desse contexto, diferentes tipos de análises e monitoramentos são necessários para avaliar as comunidades microbianas provenientes de ambientes impactados. Vários estudos têm utilizado métodos tradicionais de isolamento seletivo e cultivo de microrganismos para caracterização desses ambientes. Contudo, esses métodos possuem limitações devido às variações das características fenotípicas das bactérias (WOO et al., 2008). Por esta razão, outras técnicas, como o sequenciamento do gene 16S *rRNA* e a matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), são propostas por serem capazes de fornecer informações de forma rápida e confiável, permitindo compreender a dinâmica e distribuição de bactérias no ambiente (SILVA, et al., 2014).

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). Durante seu percurso, esse riacho recebe um aporte de carga poluidora de resíduos provenientes de laboratórios de ensino e pesquisa; resíduo hospitalar, além de despejo doméstico oriundos da população circunvizinha. O efeito cumulativo dos resíduos descartados inadequadamente vem provocando mudanças na dinâmica desse ecossistema, afetando a qualidade da água, a micro e macro fauna e flora existentes (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2013; FREITAS et al., 2016).

O presente estudo tem como objetivo caracterizar a microbiota do Riacho Cavouco por meio de diferentes técnicas de identificação, e comparar os perfis fenotípicos e genéticos de isolados clínicos e ambientais de *Klebsiella pneumoniae*, além de avaliar o efeito do mercúrio na formação de biofilme nessa espécie.

1 OBJETIVOS

1.1 GERAL

- Avaliar a qualidade da água e caracterizar a microbiota do riacho Cavouco por meio de diferentes técnicas, além de comparar perfis genotípicos e fenotípicos de isolados clínicos e ambientais de *Klebsiella pneumoniae* e avaliar o efeito do mercúrio (Hg^{2+}) sobre a formação de biofilme.

1.2 ESPECÍFICOS

- Realizar o isolamento e a caracterização bacteriana em diferentes pontos do riacho Cavouco;
- Avaliar e comparar a eficiência das diferentes técnicas utilizadas na diferenciação das espécies investigadas;
- Avaliar a qualidade da água por quantificação de coliformes totais e termotolerantes;
- Analisar e comparar isolados clínicos e ambientais de *K. pneumoniae* quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilmes na presença e ausência do mercúrio;
- Avaliar a hidrofobicidade da superfície celular dos isolados de *K. pneumoniae*;
- Pesquisar a presença dos genes *cps*, *fimH*, *mrkD* e *merA* em isolados clínicos e ambientais de *K. pneumoniae*;
- Analisar a diversidade genética entre isolados de *K. pneumoniae*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 AMBIENTE AQUÁTICO IMPACTADO

A água é um recurso natural indispensável à sobrevivência do homem e dos demais seres vivos (ANA, 2012; PAZ et. al., 2000). Segundo Raucci (2001), 97% da água do planeta encontram-se nos oceanos, e dos 3% restantes, apenas 0,3% está disponível para o consumo humano, sendo armazenada em mananciais, lagos, rios e lençóis subterrâneos.

A água destinada para o consumo humano deve obedecer aos padrões de potabilidade, ou seja, deve estar livre de qualquer contaminação, seja esta de origem química, física, radioativa ou microbiológica, não devendo oferecer riscos à saúde humana (CONAMA, 2011).

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), o acesso ao abastecimento de água e saneamento é um direito humano, sendo vital para a dignidade e saúde de todas as pessoas. Entretanto, ainda existe cerca de 1,1 bilhões de pessoas sem acesso a água potável e 2,4 bilhões de pessoas sem acesso a serviços de saneamento básico (WHO, 2014).

A diminuição da qualidade da água tornou-se um dos mais graves problemas mundiais, fato que vem sendo intensificado pelo aumento da população e à ausência de políticas públicas destinadas para a preservação dos recursos hídricos. Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (2016), aproximadamente, metade da população mundial em desenvolvimento será acometida por doenças diretamente relacionadas com a água fora dos padrões de qualidade e/ou com falta de saneamento adequado ou mesmo inexistente.

A contaminação das águas naturais representa um dos principais riscos à saúde pública, fato que está diretamente relacionado com a descarga de efluentes domésticos, hospitalares e industriais não tratados, que provocam a contaminação dos corpos aquáticos por microrganismos patogênicos, como bactérias, vírus, protozoários e ovos de helmintos (GELDREICH, 1998).

2.2 MICRORGANISMOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS IMPACTADOS

O ambiente aquático é altamente complexo e diversificado, compreendendo vários tipos de ecossistemas como os rios, lagos, riachos, estuários mares e oceanos. Todos esses ecossistemas são produtos dinâmicos de interações complexas entre componentes bióticos e abióticos característicos de cada um deles. Alterações nas propriedades físicas e químicas

desses ecossistemas podem afetar significativamente as formas de vida ali presentes (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995; ZHANG; ZHANG; FANG, 2009).

O crescimento acelerado da população e da urbanização tem gerado grandes mudanças nesse ambiente, tais como: desvio do curso natural de rios, lançamentos de efluentes domésticos e industriais não tratados, desmatamentos, mineração, eutrofização artificial e outros (GOURLART; CALLISTO, 2003), trazendo consequências diretas e indiretas para os ecossistemas.

No ambiente aquático, o principal fator que põe em risco a saúde pública é a ocorrência de poluição de origem fecal, pela presença de diversos microrganismos patogênicos (GELDREICH, 1998). Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (2016), a água contaminada por esses microrganismos é responsável por 80% das doenças nos países em desenvolvimento.

Outro problema que atinge o ambiente aquático é a contaminação por bactérias resistentes provenientes dos seres humanos e animais expostos a antimicrobianos (SKAKIBAIE et al., 2009; AL-BAHRY et al., 2009; GUSATTI et al., 2009; PRADO, et al., 2008), bem como pela eliminação de resíduos antimicrobianos provenientes de efluentes domésticos e hospitalares.

Os antimicrobianos são a principal fonte de mudanças em microambientes naturais e estudos vêm demonstrando que estes representam um risco ao ambiente e à saúde humana, mesmo em baixas concentrações (KUMMERER, 2009), podendo persistir no ambiente aquático por vários meses após a administração (POULIQUEN; LE, 1996; HIRSCH et al., 1999), afetando a comunidade microbiana e introduzindo a resistência bacteriana ao ambiente (TENDENCIA; DE LA PENA, 2002).

Dentre diferentes nichos ecológicos, o ambiente aquático é considerado o mais eficiente para a seleção de populações bacterianas resistentes. Este ambiente é propenso a constantes mudanças que podem exercer uma pressão seletiva, favorecendo a evolução destes microrganismos com relação ao processo de adaptação a diversos agentes antimicrobianos (WOODFORD et al., 2014).

As bactérias possuem a capacidade de se multiplicar em curto espaço de tempo, sofrer mutação e trocar seu material genético entre linhagens da mesma espécie ou até entre gêneros (CARATTOLI, 2009). Estudos sugerem que o aumento da frequência de bactérias resistentes na água é influenciado pela troca de genes de resistência, por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons codificadores de resistência aos antimicrobianos (ALI ABADI; LEES, 2000; WEGENER; MOLLER, 2000; LU et al., 2010).

Além dos antimicrobianos, outros poluentes podem desencadear impactos negativos às formas de vida presentes nesse ambiente. Dentre os principais poluentes, destacam-se os metais pesados que ao serem introduzidos no ambiente também podem causar modificações na estrutura e na função das comunidades microbianas (DOELMAN et al., 1994).

Diante do aumento da concentração de metais pesados no ambiente, em grande parte devido às atividades humanas, microrganismos vêm desenvolvendo vários mecanismos de resistência que permitam sua sobrevivência (ADARSH et al. 2007). Entretanto, esses mecanismos podem desencadear sérias implicações, visto que, podem contribuir para a evolução de genes de resistência a antimicrobianos devido ao aumento da pressão seletiva no ambiente (SARMA et al., 2010).

2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS METAIS PESADOS

O termo “metais pesados” é utilizado para identificar um grupo de elementos químicos que apresentam densidade atômica maior que 5 g cm^{-3} ou que possuem número atômico maior que 20 (MARQUES et al., 2002). Alguns desses elementos, como Sódio (Na), Magnésio (Mg), Potássio (K), Cálcio (Ca), Zinco (Zn) e Cobre (Cu), são microelementos essenciais para várias formas de vida, pois são necessários para o funcionamento de algumas rotas metabólicas (AGUIAR et al., 2002). Entretanto, o excesso ou carência desses elementos pode levar a distúrbios nos organismos, e em casos extremos, até a morte (VIRGA et al., 2007). Já outros elementos como mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As), são altamente tóxicos mesmo quando presentes em baixas concentrações, e respondem pela maioria dos problemas de saúde devido à poluição ambiental (WHO, 1996).

Os metais pesados participam do ciclo ecobiológico global, derivam de inúmeras fontes e são transportados dinamicamente através da atmosfera, solo e águas e por não serem biodegradáveis, podem permanecer no ambiente por longos períodos (LINDE et al., 1996). Nos sistemas aquáticos podem ser introduzidos como resultado de processos naturais, como intemperismo, erosão e erupções vulcânicas (FOSTER; CHARLESWORTH, 1996). Entretanto, nas últimas décadas, o aumento da urbanização e industrialização tem contribuído para o grande aumento desses contaminantes no meio ambiente, em todo o mundo (FASHOLA et al., 2016).

Dentre os vários metais, mercúrio, cádmio e chumbo destacam-se por estarem associados a contaminações do ambiente aquático, podendo causar problemas de intoxicação ao homem e demais organismos. Estes elementos são capazes de reagir com moléculas e com

ligantes presentes nas membranas celulares, conferindo-os as propriedades de bioacumulação, biomagnificação na cadeia alimentar, persistência no ambiente e distúrbios metabólicos dos seres vivos (TAVARES; CARVALHO, 1992).

2.3.1 Características Gerais do Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um elemento químico de massa atômica 200,5 e pontos de fusão igual a $-38,87^{\circ}\text{C}$ e de ebulição $356,9^{\circ}\text{C}$, sendo o único metal que se apresenta no estado líquido à temperatura ambiente (25°C) (HOBMAN; BROWN, 1997). Pode ser encontrado em diferentes espécies químicas com solubilidade, reatividade e toxicidade distintas. No ambiente pode apresentar-se como um composto inorgânico e/ou orgânico. Na forma inorgânica pode ser encontrado sob três diferentes estados de oxidação: o Hg elementar (Hg^0), o qual se encontra principalmente na forma de gás, o íon mercuroso (Hg^{+}), forma pouco estável em sistemas naturais, e o íon mercúrico (Hg^{+2}). Na forma orgânica, o íon mercúrico apresenta-se ligado covalentemente a um radical orgânico, sendo o metilmercúrico (CH_3Hg^{+}) e o dimetilmercúrico ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) os mais comuns (CANELA, 1995; HORVAT et al., 1996; JARDIM, 1988).

Este metal é emitido para o ambiente por fontes naturais (erupções vulcânicas e presença em sedimentos) e antropogênicas, como o processamento de minérios, fabricação de cloro/soda-cáustica, tintas, pesticidas, fungicidas, produtos odontológicos, entre outros (CANELA, 1995; CLARKSON, 1990; MAXSON, 2005). Não apresenta função biológica estabelecida, podendo ser altamente tóxico dependendo da sua forma química, causando diferentes impactos no ecossistema e na saúde humana (JAN, et. al., 2009; MAXSON, 2005).

Nos ambientes aquáticos, a especiação do mercúrio é influenciada pela interação com a biota e complexos orgânicos e inorgânicos presentes na coluna d'água e sedimentos (RAVICHANDRAN, 2004). Nesses ambientes, a emissão de mercúrio representa um sério risco ambiental devido à possibilidade de biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio pela ação de bactérias, principalmente nos sedimentos.

O metilmercúrio é um composto lipossolúvel, e por isso, é facilmente absorvido pelas membranas biológicas. Possui a capacidade de permanecer por longos períodos nos tecidos dos organismos, acelerando a bioacumulação e a biomagnificação nas cadeias alimentares e, portanto, maximizando seus efeitos na saúde humana (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – IPCS, 1990; PORCELLA, 1994; ROULERT et. al., 1998a; LIN; PEHKONEN, 1999; BOENING, 2000; AMORIM et al., 2000).

2.4 RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS

A contaminação ambiental por metais pesados vem aumentando nos últimos anos, em virtude das mais diversas atividades antropogênicas. Os metais pesados por não serem biodegradáveis, apresentam a tendência a biomagnificação e bioacumulação e são extremamente tóxicos a várias funções biológicas, causando sérios impactos ao meio ambiente e à saúde humana (LI et al., 2013).

Microrganismos presentes em ambientes contaminados desenvolveram diferentes mecanismos de resistência para se adaptarem ao estresse causado por metais pesados. A capacidade de sobreviver nessas condições extremas depende de atributos bioquímicos e fisiológicos adquiridos, além de adaptações genéticas (ABOU-SHANAB et al., 2007).

Dentre os vários mecanismos, intra e extra-celulares, destacam-se: bioacumulação (BLINDAUER et al., 2002), bioissorção (QUINTELAS et al., 2013), biomineralização e precipitação (PODDA et al., 2000; MIRE et al., 2004), oxidação e redução enzimática do metal para a forma menos tóxica (SILVER, 1996), produção de sideróforos (SCHALK et al., 2011) e formação de biofilme (TAGA; BASSLER, 2003; VON BODMAN et al., 2003).

Vários estudos sugerem que a contaminação por metais no ambiente natural pode ter um papel importante na manutenção e proliferação da resistência aos antimicrobianos (Tabela 1), (SUMMERS, 2002; SUMMER et al., 1993; ALONSO et al., 2001). No meio ambiente, a pressão seletiva exercida pelos metais podem selecionar isolados resistentes de maneira semelhante aos antibióticos, uma vez que ambos os genes de resistência estão frequentemente localizados nos mesmos elementos móveis (FUGIMORE et al., 1996; MCINTOSH et al., 2008).

Martins et al. (2014) observaram que isolado de *Pseudomonas aeruginosa*, obtido de um rio contaminado do sudeste brasileiro, apresentava um plasmídeo conjugativo com co-resistência a tetraciclina e cobre, reforçando que a resistência aos antibióticos pode ser induzida pela pressão seletiva de metais pesados no ambiente. Caille et al. (2007) demonstraram que em *Pseudomonas aeruginosa*, o cobre pode induzir a resistência ao imipenem pelo mecanismo de sistema regulatório de dois componentes CopR-CopS. Ghosh et al. (2000) verificaram a resistência a ampicilina, arsênio, cromo, cádmio e mercúrio em plasmídeos de isolados de *Salmonella abortus equi* e observaram que após a remoção dos plasmídeos os isolados tornaram-se sensíveis a esses compostos.

Tabela 1: Exemplos de características estruturais e funcionais compartilhadas em mecanismos de resistência a metais e antibióticos

Mecanismos de resistência	Metais pesados	Antibióticos	Referências
Redução na permeabilidade	As, Cu, Zn, Mn, Co, Ag	Cip, Tet, Cholr, β -lactâmicos	Silver (1996), Ruiz (2003)
Alteração da droga e do metal	As, Hg	β -lactâmicos, Chlor	Mukhopadhyay et al. (2002), Wright (2005)
Efluxo da droga e do metal	Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As	Tet, Chlor, β -lactâmicos	Nies (2003), Levy (2002)
Alteração da sinalização celular	Hg, Zn, Cu	Cip, β -lactâmicos, Trim, Rif	Barkay et al. (2003), Roberts (2005)

Abreviações: Cholr-clorofenicol; Cip-ciprofloxacina; Rif- rifampicina; Tet-tetraciclina; Trim-trimetropim. Fonte: Adaptada de Baker-Austin et al. (2006).

Com o intuito de corroborar com a evidência da co-resistência de metais e antibióticos, alguns estudos compararam os perfis de resistência de bactérias coletadas em ambientes contaminados e não contaminados. Rasmussen e Sorensen (1998) demonstraram um aumento na ocorrência de plasmídeos conjugativos em locais contaminados e observaram que os genes de resistência a mercúrio e a tetraciclina estavam localizados no mesmo plasmídeo. MacArthur e Tuckfield (2000) examinaram perfis de resistência a metais e antibióticos, em sedimentos de riacho contaminados e não contaminados, e observaram que os isolados obtidos do sedimento contaminado apresentaram-se mais resistentes a canamicina e estreptomicina que os demais.

Desse modo, não apenas o uso indiscriminado de antibióticos, mas também a contaminação ambiental por metais pesados podem oferecer riscos e danos à saúde humana, visto que os genes de resistência podem ser transferidos horizontalmente dos microrganismos ambientais para os comensais humanos (BAKER-AUSTIN et al., 2006).

2.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma espécie do gênero *Klebsiella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, apresenta-se como um bacilo Gram-negativo, aeróbio facultativo, imóvel e não esporulado. É envolvido por cápsulas mucoides polissacarídicas que têm como função proteção contra ação bactericida e fagocitose, além de auxiliar na aderência celular (MARTINEZ et al., 2004). Como características bioquímicas, são Voges-Proskauer positivo, produção de indol e H₂S negativos, arginina e ornitina negativos e mobilidade negativo, utilização de citrato positivo e produção de uréase positivo (MURRAY et al., 2005).

Em contraste a outros patógenos bacterianos, *K. pneumoniae* é ubíqua na natureza. Os seus *habitats* não clínicos incluem fontes ambientais como águas de superfície, solo, vegetação, esgotos e efluentes industriais, bem como a colonização comensal de superfícies mucosas em humanos e outros animais (BARATI et al., 2016; STAHLHUT et al., 2009). Alguns estudos vêm demonstrando que *K. pneumoniae* de origem ambiental são altamente similares a isolados clínicos, compartilhando características fenotípicas e genéticas (MATSEN et al., 1974; PDSCHUN et al., 2000; BARATI et al., 2016).

É considerado um patógeno oportunista por acometer pacientes imunocomprometidos hospitalizados e em condições debilitantes, sendo responsável por uma variedade de infecções, tais como pneumonia, septicemia, infecções urinárias e pulmonares (TRABULSI et al., 2008). Em indivíduos saudáveis, esta bactéria é encontrada com frequência de 19% nas fezes e de 1 a 6% na orofaringe. Em pacientes hospitalizados pode haver um aumento dessa frequência para 77% nas fezes e 19% na orofaringe (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

A importância dessa espécie bacteriana no ambiente hospitalar está relacionada com a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência aos antimicrobianos, principalmente aos β -lactâmicos, o que pode ser explicado pela facilidade na aquisição de plasmídeos de resistência (TRABULSI et al., 2008; FATIMA et al., 2018). A multirresistência apresentada por *K. pneumoniae* está se tornando um problema de saúde pública, sendo em grande parte relacionada com os isolados que expressam enzimas beta-lactamases de espectro estendido ESBLs que hidrolisam um amplo espectro de β -lactâmicos (MILLIS et al., 2016; MOGHADAMPOUR et al., 2018).

A resistência a outras classes de antimicrobianos entre isolados produtores de ESBL limita as opções terapêuticas, tornando os carbapenêmicos os agentes mais eficientes (SCHWABER et al., 2005; TUMBARELLO et al., 2007). Entretanto, esta espécie apresenta um eficiente mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, conhecido como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (NORDMANN et al., 2009). Vários estudos têm reportado a frequência de isolados produtores de KPC em diferentes partes do mundo, inclusive no Brasil (YEGNESWARAN, et al., 2010; CABRAL et al., 2012; TANSARLI et al., 2018), sendo relacionada com os altos índices de morbidade e mortalidade produzida por essa bactéria (KANWAR et al., 2018).

A patogênese e a capacidade de persistência em diferentes ambientes por *K. pneumoniae* está relacionada com sua capacidade de formar biofilmes (BARRETO et al., 2009) e regular a expressão de vários fatores de virulência (DAVIS et al., 2015; RUNCHAROEN et al., 2017). Alguns estudos têm analisado a relação entre a formação de

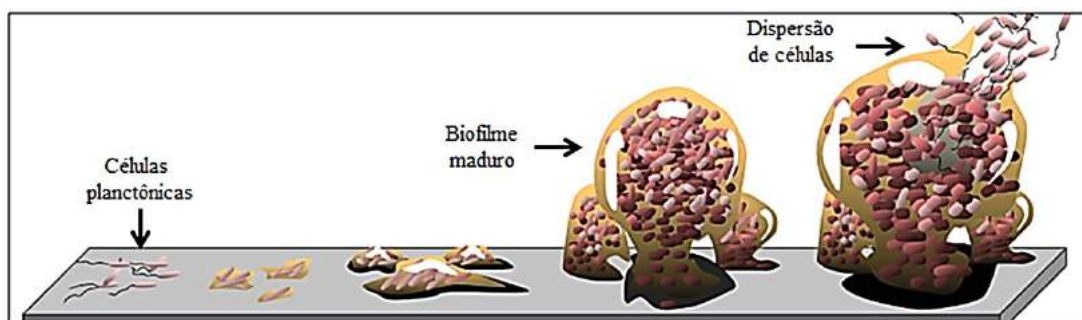
biofilme e a susceptibilidade e penetração de antimicrobianos. Ander et al. (2000) evidenciaram a limitada capacidade de penetração dos antimicrobianos ampicilina e ciprofloxacina em biofilmes formados por *K. pneumoniae*. Bellifa et al. (2013) reportaram a resistência de isolados formadores de biofilme, obtidos de dispositivos médicos, a outros antimicrobianos como gentamicina, cefotaxima e ciprofloxacina.

A formação de biofilme por esta bactéria está relacionada também a fatores de virulência. *K. pneumoniae* produz vários fatores de virulência, como as adesinas fimbriais, sideróforos, antígenos S e antígenos capsulares (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; MELO et al., 2014; LOPES et al, 2016). Dentre esses fatores, a produção de cápsula polissacarídica e as fímbrias tipo 1 e tipo 3 predominam em *K. pneumoniae* e contribuem para a formação dessas estruturas (LI et al., 2014).

2.6 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BIOFILMES

Biofilme é uma estrutura porosa e complexa, formado por uma ou mais espécies de microrganismos, organizada em várias camadas aderidas de modo irreversível a uma superfície biótica ou abiótica e envolvidas numa matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (TRENTIN et al., 2013). São formados de maneira dinâmica e gradual, envolvendo várias etapas. A primeira é a adesão bacteriana reversível que pode ocorrer em superfícies bióticas, mediadas por interações moleculares ou em superfícies abióticas, por meio de interações físico-químicas. A segunda consiste na adesão irreversível, onde ocorre a consolidação do processo de adesão por meio da produção de EPS. 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 1) (TRENTIN et al., 2013; MONROE, 2007).

Figura 1: Representação das etapas da adesão e formação de biofilme bacteriano.



Fonte: Adaptado de Monroe (2007).

As bactérias na forma de células livre (planctônicas) não são frequentemente encontradas na natureza, a maioria delas vive em comunidades ou aderidas a diversas superfícies bióticas ou abióticas, como por exemplo, equipamentos clínicos e industriais. Vários fatores podem contribuir para a adesão bacteriana como: flagelos, fimbrias, 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 formação de biofilme é uma estratégia eficaz para a sobrevivência e persistência microbiana em condições de estresse, como por exemplo, na presença de antimicrobianos e metais pesados (AZEVEDO; CERCA, 2012). Estudos têm demonstrado que concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos podem induzir a formação de biofilme (KAPLAN et al., 2012; HENNEQUIN et al., 2012). De forma semelhante, diversos trabalhos têm reportado o aumento na formação de biofilme na presença de diferentes metais, como níquel (PERRIN et al., 2009), cádmio (WU et al., 2015), chumbo (GIOVANELLA et al., 2017), entre outros.

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, essa estrutura pode permitir a transferência de genes de resistência, facilitando o surgimento de cepas multirresistentes que são rapidamente disseminadas no meio ambiente (KRAGH et al., 2016).

2.7 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

Tradicionalmente, as técnicas de identificação e diferenciação de linhagens bacterianas são baseadas nas características morfológicas e fenotípicas das amostras. Contudo, essas técnicas convencionais são, muitas vezes, limitadas por sua baixa capacidade de diferenciação entre linhagens de uma determinada espécie e também devido, muitas vezes, à baixa reprodutibilidade dos testes (OLIVE; BEAN, 1999).

Com o avanço da biologia molecular, diversas técnicas foram desenvolvidas para a identificação e caracterização de microrganismos, contribuindo significativamente para um grande avanço do conhecimento da diversidade microbiana. Em geral, essas técnicas baseiam-se na análise das proteínas e principalmente dos ácidos nucleicos, apresentando diferentes níveis de resolução para a detecção da variabilidade genética entre linhagens bacterianas (PALLERONI, 1993)

2.7.1 Gene *16S rDNA*

O ribossomo das células procarióticas é constituído pelo RNA ribossomal e por várias proteínas. Ele é composto de duas subunidades principais, a 40S (subunidade maior) e a 30S (subunidade menor). Na subunidade maior estão as moléculas de 23S, 5S rRNA e mais 31 proteínas. Na subunidade menor estão o *16S rRNA* e mais 21 proteínas (WOODSON; LEONTIS, 1998).

Os genes que codificam os rRNAs procarióticos são organizados em operons (*rrn* operon) formados pelos três genes que codificam os rRNA: *16S rDNA*, *23S rDNA* e *5S rDNA*. Cada um desses genes é separado por uma região espaçadora intergênica (ISRs), que contém um ou mais genes de RNA transportador (tRNA) (CLARRIDGE, 2004)

Esses genes correspondentes aos RNAs ribossômicos são utilizados para as determinações filogenéticas, pois apresentam todas as características que definem um marcador molecular, tais como: a) estão universalmente distribuídos e têm a mesma função em todos os organismos; b) originaram-se de genes ancestrais comuns, portanto são homólogos; c) possuem regiões bastante conservadas e outras mais variáveis, onde a taxa de variação nucleotídica pode ser estatisticamente correlacionada com a distância entre gêneros e espécies (CLARRIDGE, 2004) e d) os *rRNAs 16S* e *23S* são moléculas razoavelmente grandes, tendo portanto informações suficientes para comparações estatisticamente significativas (ROSADO et. al., 1997).

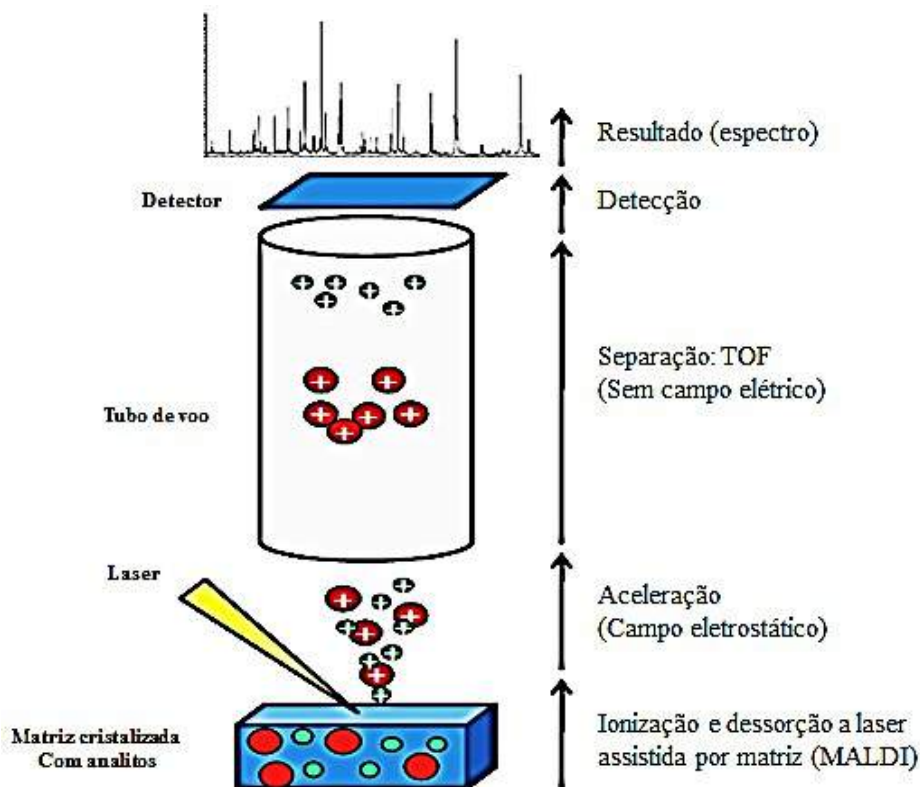
O gene *16S rDNA* possui aproximadamente 1500 nucleotídeos e geram grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas. O gene *23S rDNA* tem aproximadamente 3000 nucleotídeos e contem duas vezes mais informações que o gene *16S rDNA*. Apesar disso, esta região por ser menor, tem maior facilidade de sequenciamento, sendo assim a mais utilizada para propósitos taxonômicos. Contudo, o *23S rDNA* tem sido utilizado como suplemento para os dados gerados pelo estudo do *16S rDNA* em organismos intimamente relacionados (STAHL, 1997).

A análise comparativa de sequências nucleotídicas do gene *16S rDNA* tem sido largamente utilizada em estudos taxonômicos e de identificação de bactérias. A vantagem de utilizar essa técnica é a disponibilidade de um grande número de sequências desse gene depositadas em bancos de dados como Gen-Bank, RDP, EMBL, possibilitando a comparação de novas sequências obtidas com as sequências presentes nessas bases (COUTINHO et al., 1999).

2.7.2 Características Gerais do MALDI-TOF-MS

Em microbiologia, a técnica de MALDI-TOF-MS (Figura 3) é utilizada para identificar uma diversidade de microorganismos incluindo bactérias, fungos e vírus. Devido à capacidade para caracterizar microrganismos, essa técnica tem sido amplamente aplicada em diagnósticos clínicos, e em menor proporção em trabalhos de 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).

Figura 2: Representação esquemática das etapas de análise por MALDI-TOF-MS.



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

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 microorganismo (AVANZI et al., 2017).

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., 2017). 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 microrganismos de importância clínica, novas informações podem ser acrescentadas na base de dados (AVANZI et al., 2017). 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).

2.8 TIPAGEM MOLECULAR DE MICRORGANISMOS

Nos últimos anos, muitas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para avaliar a diversidade de microrganismos. Dentre as diversas técnicas utilizadas para analisar a diversidade genética de linhagens bacterianas, destaca-se a ERIC-PCR, que consiste no estudo de famílias de sequências intergênicas repetitivas (30-150pb), descritas em enterobactérias, conhecidas como *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) (SHARPLES; LLOYD, 1990; VERSALOVIC et al., 1991; WILSON; SHARP, 2006).

Esses elementos ERIC contêm uma região central altamente conservada e localizada em regiões intergênicas não codificantes do genoma bacteriano e suas sequências têm sido utilizadas como base para essa técnica de tipagem bacteriana (WILSON; SHARP, 2006). Essa metodologia utiliza uma reação de polimerase em cadeia (PCR), com *primers* consenso, para amplificar regiões entre sequências ERIC, que são reveladas por perfis eletroforéticos. A comparação entre esses perfis pode ser utilizada para determinar o grau de similaridade entre linhagens (VERSALOVIC et al., 1991).

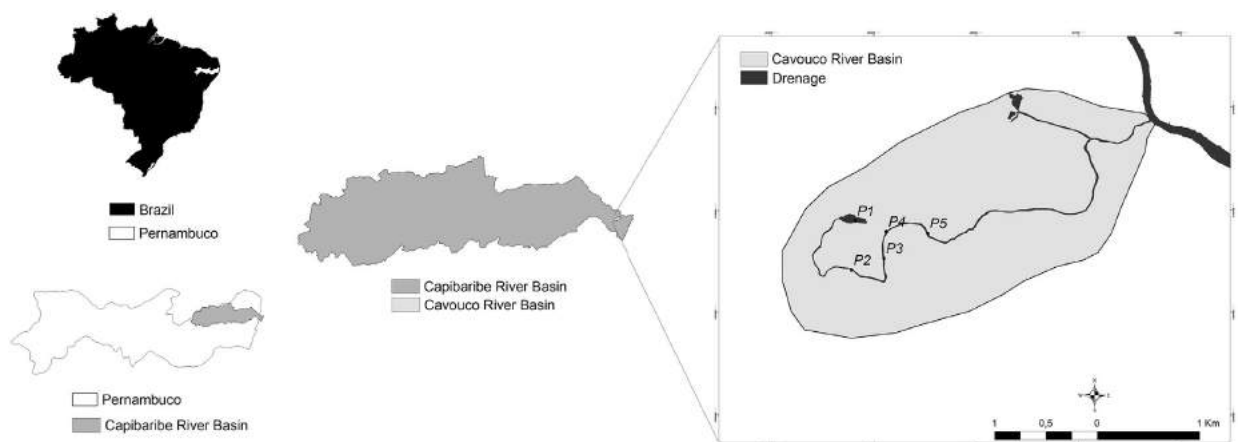
O método de ERIC-PCR tem se mostrado satisfatório para tipagem de diferentes espécies bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *Proteus vulgaris* (KHOSRAVI et al., 2016; ZHAO; DANG, et al. 2012). El-Badawy et al. (2017) demonstraram a eficácia desta técnica para genotipagem de isolados clínicos de *K. pneumoniae* obtidos de diferentes fontes. WASFI et al. (2016) compararam essa técnica com a RAPD e indicaram que a ERIC-PCR como mais eficaz na diferenciação dos isolados e correlação com perfis de resistência e fatores de virulência de *K. pneumoniae*. Adicionalmente, Seifi et al. (2016) evidenciaram que a ERIC-PCR foi eficiente na detecção de heterogeneidade entre isolados dessa espécie.

2.9 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO RIACHO CAVOUÇO

O riacho Cavouco é um afluente da margem direita da bacia hidrográfica do rio Capibaribe (Figura 3), 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).

Esse riacho perfaz um percurso de aproximadamente 6 km, no trecho que percorre dentro dos limites da Universidade, recebendo 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 inapropriado 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 3: Localização do riacho Cavouco no estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil.



Fonte: Freitas et al. (2016)

O grupo de pesquisa Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco (NuBIOMA), 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 na instituição.

Araujo e Oliveira (2013) avaliaram as características físicas e químicas desse ambiente e detectaram condições inadequadas para sobrevivência de vida aquática. Assis e colaboradores (2014) identificaram alterações enzimáticas na espécie *Oreochromis niloticus* (tilapia) coletada nesse riacho. Em seu trabalho esses autores revelaram que todas as atividades enzimáticas avaliadas se mostraram afetadas de modo negativo nessa espécie pelas condições ambientais de seu *habitat* quando comparadas a uma população controle. Esses resultados apresentam indícios de contaminação a nível bioquímico, sendo necessário o monitoramento e maiores investigações sobre seus agentes poluidores. De forma similar o trabalho realizado por Araujo et al., (2016) identificaram que a acetilcolinesterase oriunda do cérebro de *Parachromis managuensis* (espécie obtida nesse riacho) pode ser utilizada como um potencial biomarcador para monitoramento de ambientes aquáticos impactados por metais pesados e pesticidas.

Um estudo recente realizado por Freitas et al. (2016) mostrou que a combinação de sulfato de alumínio e de uma lectina (WSMoL), extraída de *Moringa oleifera* foi satisfatória na redução da turbidez e da ecotoxicidade de uma amostra de água poluída desse riacho. Trabalhos paralelos vêm sendo desenvolvidos pelo grupo NuBioma neste e em outros ambientes impactados.

3. Resultados

3.1 MICROBIOTA SAMPLES FROM A POLLUTED STREAM IN RECIFE-PE, BRAZIL AND IMPORTANCE TO PUBLIC HEALTH.

academicJournals

Vol. 11 (28), pp. 1142-1149, 28 July, 2017

DOI: 10.5897/AJMR2017.8577

Article Number: C59282265357

ISSN 1996-0808

Copyright © 2017

Author(s) retain the copyright of this article

<http://www.academicjournals.org/AJMR>

African Journal of Microbiology Research

Full Length Research Paper

Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health

Antonio Fernando da Purificação Júnior¹, Livia Caroline Alexandre de Araújo², Ana Catarina de Souza Lopes³, Marcela de Araújo Sobral⁴, Gláucia Manoella de Souza Lima⁴, Márcia Vanusa da Silva⁵, Maria Tereza dos Santos Correia⁵ and Maria Betânia Melo de Oliveira^{5*}

¹Genetic, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

²Biological Science, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

³Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

⁴Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

⁵Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

Received 3 May, 2017; Accepted 7 July, 2017

Pollution of water bodies can cause environmental and public health problems. The Cavouco stream is a tributary of the Capibaribe River, one of the main rivers in the state of Pernambuco, Brazil, and receives a high pollution load from residential, laboratory and hospital effluents. The aim of the present study was to perform phenotypic and molecular characterization in this stream, and evaluate the water quality using microbiological parameters. Water was collected from five sampling points, and bacterial species were identified using biochemical and molecular methods through 16S rRNA gene sequence analysis. Total and thermotolerant coliforms were also quantified. Fermenting Gram-negative bacilli from the family Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*), non-fermenting bacilli (*Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*) and Gram-positive bacilli (*Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* and *Staphylococcus hominis*) were identified. A total of 25 bacterial isolates were phenotypically identified. All phenotypic identifications were confirmed by molecular analysis, except for *S. hominis*, which was molecularly identified as *Exiguobacterium*. Regarding water quality, all analyzed samples were positive for total and thermotolerant coliforms. The results obtained suggest that the Cavouco stream presents a potential risk for transmission of water-borne diseases, because of the presence of pathogenic bacteria. In addition, the current state of the stream also threatens the conservation of its native species.

Keywords: Public health, Enterobacteriaceae, thermotolerant, Bacilli.

INTRODUCTION

Aquatic ecosystems have suffered significant changes due to multiple environmental effects, resulting from the release of large quantities of effluent without prior treatment (International Joint Commission, 2015; USGS, 2015). This discharge can cause physical, chemical and

biological deterioration, and endangers both the resident aquatic organisms and public health. Scientific, technological and epidemiological advances have provided new tools for the assessment of water quality, both for human consumption and environmental

purposes (Tanchou, 2014).

In 2015, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) reported that approximately 780 million people had no access to drinking water around the world. The consumption of contaminated water and lack of basic sanitation is estimated to cause 842,000 deaths per year worldwide, and 1,000 children under the age of five years die every day (WHO, 2014; WHO and UNICEF, 2015). Contaminated water carries pathogens that cause diarrhea, gastrointestinal disorders and systemic diseases, approximately 70% of diarrheal diseases could be avoided by improving basic sanitation (WHO, 2014). According to the Brazilian Ministry of Health, 6,715 deaths caused by diarrhea or gastroenteritis, presumably resulting from infection, were recorded between 2010 and 2015 (BRASIL, 2015).

Some studies have used traditional methods of selective isolation and cultivation to characterize the microbial communities of the affected environments (Skariyachan et al., 2013). However, taxonomic classification by these methods can be difficult because of variations in phenotypic characteristics (Woo et al., 2008). For this reason, molecular methods that allow fast and reliable confirmation of microbial identity have been developed (Ramírez-Castillo et al., 2015). Among these, methods using *16S rRNA* gene sequencing are predominant. This gene is used as a phylogenetic marker because its sequences are highly conserved (Srinivasan et al., 2015).

The aim of the present study was to evaluate the water quality by the isolation and identification of representative bacterial species present in this environment, using biochemical and molecular methods.

METHODS

Study area

The Cavouco stream, located at latitude 8°2'52.05"S and longitude 34°57'10.33" W, state of Pernambuco (UFPE), Brazil, is approximately 6 km long, and flows into the right margin of the Capibaribe River, one of the main rivers of state. Along its course, it receives pollutants from residential, laboratory and hospital waste, which reduces the water quality and threatens the aquatic life (Araújo and Oliveira, 2013; Freitas et al., 2016). Water samples (200 mL) were collected from five points (Figure 1) along the stream, according to the methods of Araújo and Oliveira (2013), and stored between 1 and 4°C until subsequent bacteriological analysis.

Isolation and phenotypic identification of bacterial isolates

For bacterial isolation, 50 µL of water was inoculated onto eosin

methylene blue (EMB) agar and 5% bovine blood agar (to count colony forming units), and incubated at 37°C for 24 to 48 h. Gram staining was then performed to make presumptive identifications of the bacteria found according to the technique described by Koneman and Winn (2006).

Gram-negative isolates were preliminarily identified using the following biochemical tests: glucose, lactose and sucrose fermentation, hydrogen sulfide production, motility, indole production and citrate, lysine and urea degradation. Species identification was confirmed using the Kit API 20E (Biomérieux), according to the manufacturer's instructions.

Gram-positive isolates were preliminarily identified through colony morphology, hemolysis in blood agar, and presence/absence and position of spores, visualized through Gram staining. Species identification was confirmed using an automated system (BD Phoenix™ Automated Microbiology System).

Analysis of total and thermotolerant coliforms

For analysis of total and thermotolerant coliforms, water samples were collected from the water surface at a depth of 30 cm, from each of the five sampling points. The samples were stored between 1 and 4°C until analysis.

The presence and number of total and thermotolerant coliforms were determined using the multiple-tube fermentation method, and the results were expressed as most probable number (MPN) per 100 mL of sample, according to APHA (2015).

Molecular identification using *16S rRNA* gene sequence analysis

The bacterial samples were inoculated into 5 mL brain heart infusion (BHI) broth for 24 h at 37°C for to DNA extraction. Chromosomal DNA was extracted using the phenol-chloroform method (Sambrook and Russell, 2001). DNA quality was evaluated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel using 0.5× TBE buffer and run at 100 V for 1 h; gels were analyzed using a UV transilluminator and photographed. DNA concentration was quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific).

The *16S rRNA* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR), using the primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991). PCR was performed in a final volume of 25 µL, containing 1× buffer, 200 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, Taq DNA-polymerase (1 U/µL; Invitrogen), 10 pmol of each primer, and 10 ng of DNA template. The PCR was performed using a thermocycler (C1000 Thermal Cycler – BioRad), and the PCR program consisted of 95°C for 5 min, 30 cycles at 95°C for 45 s, primer annealing at 54°C for 45 s, extension at 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 5 min.

PCR products were purified using the Pure Link purification kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and sequenced using the Big Dye Kit (Applied Biosystems) on an automated DNA sequencer (ABI 3100). The *16S rRNA* gene sequences obtained was compared with sequences deposited in the GenBank database (NCBI). The dendrogram was constructed using multiple sequence alignment, based on genetic distances, maximum parsimony, and maximum likelihood, using Molecular Evolutionary Genetic Analysis 5.2 software (MEGA5).

*Corresponding author: E-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br or mbetaniam2008@gmail.com. Tel: +55 (81) 2126 8547 R. 229 Fax: +55 (81) 2126 8576.

Author(s) agree that this article remains permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

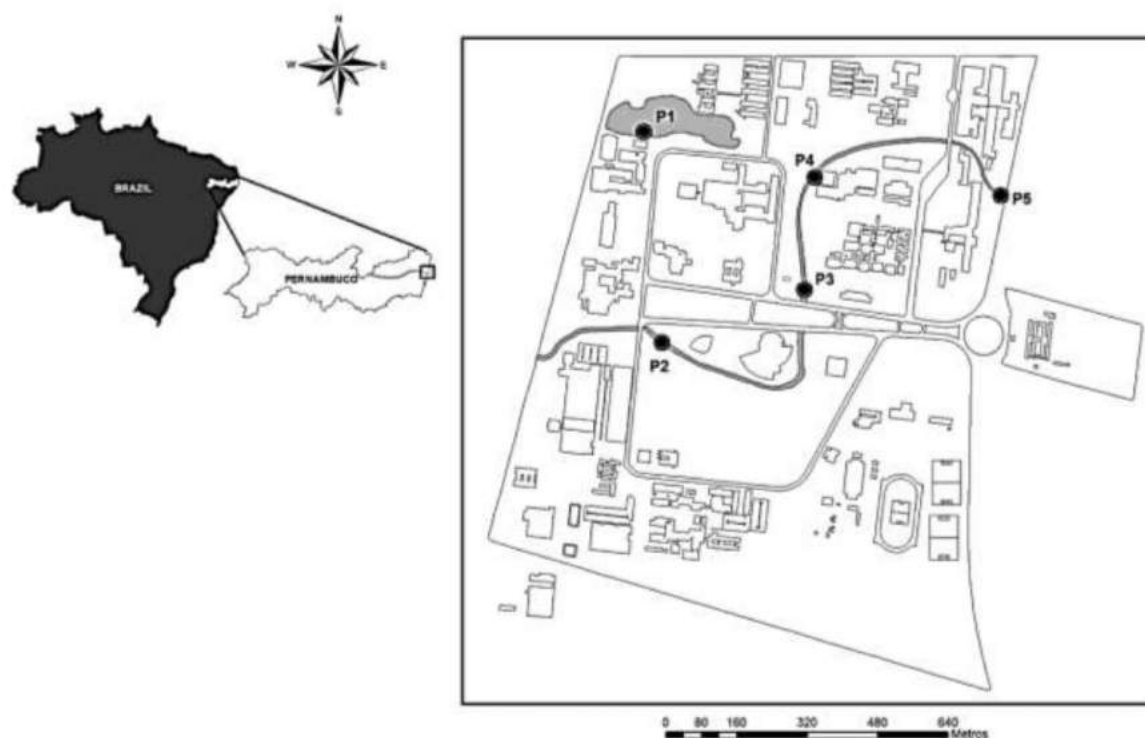


Figure 1. Representation of Cavouco creek area, Brazil, showing the five collection points (P1-P5) and microbial representatives obtained from each point.

Bacterial library of Cavouco stream – UFPE

Identified bacteria were stored in 80% glycerol (150 μ L of glycerol and 850 μ L of bacterial culture) at -80°C , and under pure mineral oil (Isofar) at ambient temperature. The isolates were labeled according to: C (Cavouco), P (sampling point), the number of sampling points, and the number of isolations.

RESULTS

Microscopic and biochemical identification of bacterial colonies

Inoculated blood agar presented innumerable colony forming units (CFU), except for water samples collected at the stream source (Point 1), for which only a few colonies were observed. Due to EMB medium selectivity, these plates presented an average of 200 CFU, with a lower number of CFUs observed for Point 1, and higher number for point 5. EMB plates presented colonies with metallic green sheen, dark center, some with bright or pink edges, and mucoid appearance. In blood agar, some colonies were shiny or gray, with or without beta-hemolysis, and with irregular edges. Microscopic examination of Gram-stained colonies revealed the presence of Gram-

negative and positive bacilli. Some Gram-positive bacilli were observed to be arranged in chains, filaments and spherical bodies. Approximately, 22 and 25 colonies were selected from the most frequent colonies present on EMB medium, and from blood agar, respectively.

A total of 25 isolates were identified phenotypically, belonging to seven genera (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus*). Enterobacteria were present in all sampling points. *Proteus mirabilis* was highly prevalent among Gram-negative species (with eight isolates mostly from point 5), followed by *Escherichia coli* (six isolates), and *Klebsiella pneumoniae* (five isolates, from points 2, 3, and 4). Among the Gram-positive bacilli, the genus *Bacillus* was prevalent, with two species (*Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus*) identified from point 4, and one (*Bacillus cereus*) from point 1. Another Gram-positive species, *S. hominis*, was identified from point 4 (Table 1).

Presence of total and thermotolerant coliforms

All analyzed samples were positive to total and thermotolerant coliforms, presenting an MPN $> 1.4 \times$

Table 1. Phenotypic and molecular identification of isolated bacteria from Cavouco stream collection points. ID: Identity. *Access number refer to sequences deposited in GenBank.

Points	Isolates	Phenotypic Identification		16S rRNA gene sequencing		
		API 20E (ID%)	BD Phoenix	Species	Similarity (%)	Accession*
P1	CP ₁ S	-	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	99	KT719668.1
	CP ₂ 3P	<i>Escherichia coli</i> (99.8%)	-	<i>Escherichia coli</i>	99	CP014225.1
P2	CP ₂ 4P	<i>Escherichia coli</i> (94.8%)	-	<i>Escherichia coli</i>	99	CP014225.1
	CP ₂ 2P	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.8%)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	KM233642.1
P3	CP ₃ 5S	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1
	CP ₃ 6S	<i>Pseudomonas putida</i> (44.5%)	-	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	JQ994361.1
	CP ₃ 8S	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.9)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	AB680212.1
	CP ₃ 9P	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (98.1%)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	AB680212.1
	CP ₃ 13P	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.7%)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	AB680212.1
	CP ₃ 7S	<i>Escherichia coli</i> (99.8%)	-	<i>Escherichia coli</i>	99	CP014225.1
	CP ₃ 10P	<i>Escherichia coli</i> (99.8%)	-	<i>Escherichia coli</i>	99	CP014225.1
	CP ₃ 11P	<i>Escherichia coli</i> (99.8%)	-	<i>Escherichia coli</i>	99	CP014225.1
	CP ₄ 14S	<i>Escherichia coli</i> (99.9%)	-	<i>Escherichia coli</i>	98	CP013837.1
P4	CP ₄ 16S	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.7%)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	KC524425.1
	CP ₄ 15S	<i>Enterobacter cloacae</i> (99.4%)	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	GU191924c.1
	CP ₄ 18S	-	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	KJ26873.1
	CP ₄ 19S	-	<i>Bacillus pumilis</i>	<i>Bacillus pumilis</i>	99	KJ526890.1
	CP ₄ 20P	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Exiguobacterium</i> spp.	99	KT074375.1
P5	CP ₅ 22S	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KF811051.1
	CP ₅ 23S	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1
	CP ₅ 25S	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1
	CP ₅ 26P	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1
	CP ₅ 27P	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1
	CP ₅ 28P	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	HQ169118.1
	CP ₅ 27P	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1

10³/100 mL.

Molecular identification using 16S rRNA gene analysis

The 16S rRNA gene sequences (approximately 1.500 bp) for the 25 selected isolates were aligned, and compared with sequences deposited in the GenBank database. The obtained sequences were found to have a high degree of genetic similarity (98-99%) with deposited sequences for the same species, confirming their phenotypic identification. Of the 25 isolates, only *S. hominis* did not display concordance between the phenotypic and molecular identification. This isolate was identified phenotypically as belonging to the genus *Staphylococcus*, but through molecular analysis, it revealed 99% similarity with the genus *Exiguobacterium* (Table 1). The phylogenetic tree showed clustering of 16S rRNA gene sequences obtained from the studied isolates with those from GenBank, confirming molecular identification (Figure 2).

Construction of the bacterial library of Cavouco

The bacterial library of Cavouco currently includes 21 Gram-negative and four Gram-positive species isolated from five sampling points, stored in frozen stocks under mineral oil. These are the first bacterial isolates of this environment, and the first representatives of the Bacterial Library of Impacted Environments of UFPE.

DISCUSSION

The analyses showed high water contamination of the Cavouco stream, located in Recife-PE, Brazil, with all samples containing thermotolerant coliforms. The presence of coliforms is a parameter evaluated for water quality monitoring programs and indicates the presence of potentially pathogenic microorganisms (WHO, 2014).

In the present study, the quantification of microbiological parameters indicated that all samples were unfit for human consumption and recreational use. The observed coliform levels were higher than those considered safe by

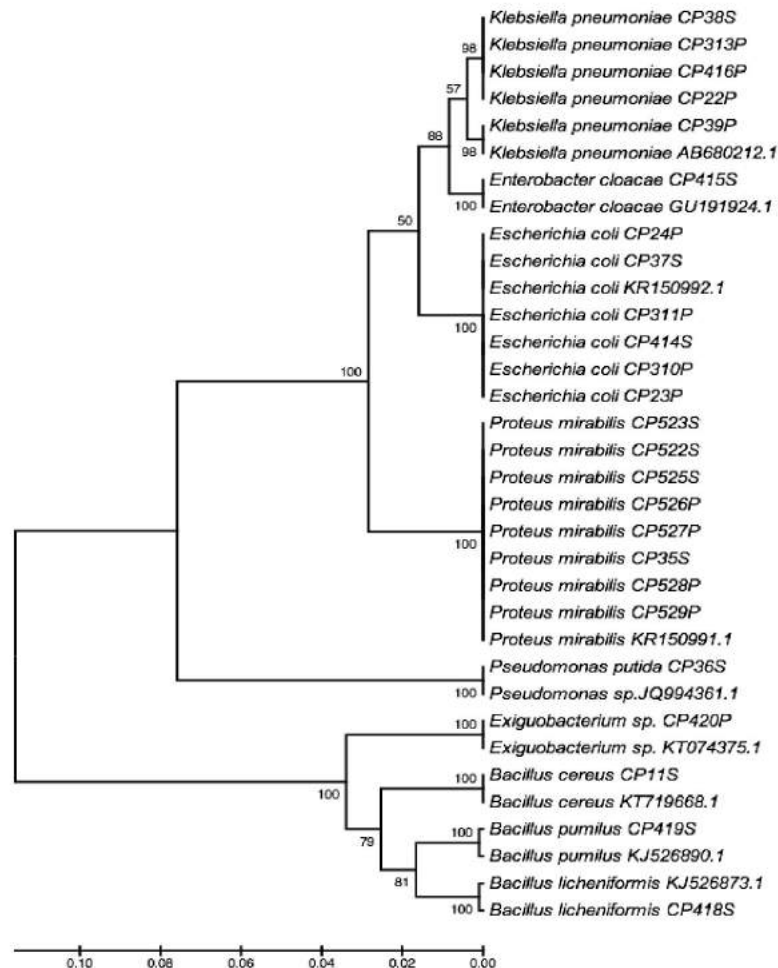


Figure 2. Similarity dendrogram generated from the comparison between the sequences of 16S rRNA strains isolated from collection points at Cavouco and the deposited ones in GenBank database.

the US Environmental Protection Agency (EPA), 2011 and the Brazilian Environmental Council (Normative Resolution N° 357/2005) (CONAMA, 2005), representing risk for human health.

Indications of significant pollution in the studied regions of the Cavouco stream had been previously observed. Araujo and Oliveira (2013) analyzed Cavouco stream water, and found changes in the levels of dissolved oxygen, ions and ammonia, as well as values of the Index of Water Quality for the Protection of Aquatic Life (IQAPVA) indicating low capacity for the maintenance of aquatic life.

Enterobacteria were present at all sampling points in the present study. Several studies have shown that most enterobacteria can cause infections because of their

ability to survive in hostile environments and their ability to develop resistance to antimicrobial drugs (Irengue et al., 2015; Tajbakhsh et al., 2015; Patel et al., 2016).

Several pipes located along the margins of the Cavouco stream discharge residential, hospital, and laboratory effluents into the stream, which explains the presence of bacteria of fecal origin. In addition, the existence of pastures for animal grazing and the development of other activities, together with the poor conservation state of the local riparian forest, could contribute to this microbiological water pollution.

Previous studies of affected environments have reported similar results. Rodrigues et al. (2009), evaluated the water quality of the Piracuma River, located in the state of São Paulo (SP), Brazil, and identified enterobacteria of

genera *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Salmonella* and *Shigella*. A study performed on a contaminated river in India also identified the presence of important pathogens for public health, namely *Edwardsiella* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. and *Staphylococcus* spp. (Skariyachan et al., 2013), with fecal coliforms being the most common pathogens in contaminated rivers and streams (Kim et al., 2013; Liu et al., 2015).

Escherichia coli was isolated from several sampling points of stream, is used as a specific indicator of fecal contamination in tropical and temperate regions (Páll et al., 2013). This species is considered one of the main causes of diarrhea in adults and children in developing countries, infection most often occurring through contact with contaminated water (Walker et al., 2007; Isidean et al., 2011) and is an important cause of urinary tract and wound infections and pneumonia in immunosuppressed hospitalized patients, and meningitis in newborn children (Wijetunge et al., 2015; Martelius et al., 2016).

Proteus spp. has been described as an important infectious agent in hospital environments (Chen et al., 2014; Murray et al., 2015). Bacteria from the genus, are commonly found in the environment, especially in locations with water pollution and soils with degraded material (Drzewiecka, 2016). A study performed in hospitals located in northeast Brazil, the same region as the present study, isolated *P. mirabilis*, which produces extended spectrum beta-lactamase (ESBL), have been reported to be an important cause of nosocomial infection in worldwide (Abreu et al., 2011). In the present study, this species was isolated in an area where there is discharge of hospital waste.

The genus *Klebsiella* is widely distributed in nature and in the gastro intestinal tract of humans and animals. *K. pneumonia* can also be found in the oropharynx of hospitalized patients, constituting a source of pulmonary infections, and usually occurring in patients with debilitating conditions such as alcoholism and diabetes (Distel et al., 2013). This species can also infect the urinary tract, cutaneous wounds, and blood, causing bacteremia, meningitis in infants, hepatic abscess, and urinary tract infections (Siu et al., 2012). This species has gained importance due to the development and inter-species and intra-species dissemination of several antimicrobial resistance mechanisms, namely, the production of beta-lactamases such as ESBLs and KPC (*K. pneumoniae* Carbapenemase), which degrade beta-lactam antibiotics, frequently detected in hospitalized patients in Recife, PE, Brazil (Lopes et al., 2010; Cabral et al., 2012; Melo et al., 2014).

The presence of the genus *Bacillus* in the Cavouco stream is worrisome. The presence of *Bacillus* in food in amounts higher than 10^6 cells per gram indicates multiplication, and indicates a high health risk (Germano and Germano, 2003). Another interesting aspect was the

observed diversity of *Bacillus* species. This might indicate that the environmental conditions (nutrients, temperature, humidity, oxygen concentration, and pH) were favorable for the multiplication and maintenance of these species at the studied site.

Bacillus species can sporulate, and the resistance conferred by these spores constitutes an important problem for the epidemiology of associated infections. Because the Cavouco stream is a tributary of the Capibaribe River, which is used as a water source for local agriculture and fishing, the presence of *Bacillus* could contribute to food contamination.

Of the five sampling points, points 3 and 4 presented the highest microbial diversity, whereas point 5 yielded only one species, *P. mirabilis*. The absence of diversity at point 5, which receives the discharge of effluents from a morgue and hospital, may have been due to difficulty of isolating Gram-positive bacteria and the lack of selectivity of the blood agar used for bacterial cultures. Another possible explanation for the difficulty in isolating Gram-positive bacteria was the presence of high concentrations of toxic substances in hospital effluents, such as antibiotics, cytostatic agents, heavy metals, disinfectants and hormones, which could have a genotoxic effect on these bacteria (Jean et al., 2012; Devarajan et al., 2015).

Molecular tools were used in the present study to confirm the phenotypic identification of the 25 isolates. The *16S rRNA* gene is widely used as phylogenetic marker, and it has been sequenced for a large number of bacterial lineages (Srinivasan et al., 2015). Most of these sequences are deposited in the GenBank database (Benson et al., 2012), and can therefore be compared with sequences of new isolates.

For isolates belonging to different species, their *16S rRNA* gene sequences must share less than 97% similarity (Goebel and Stackebrandt, 1994). The sequences obtained in the present study shared 98% or higher similarity with sequences deposited in the GenBank database, confirming the phenotypic identification of all isolates, except for *S. hominis*, which presented 98% similarity with genus *Exiguobacterium*. This can be explained by the fact that both genera have very similar morphological and biochemical characteristics, such as motility, positive catalase and urease activity, negative phosphatase and coagulase activity, presence or absence of nitrate reduction, and acid production under aerobic conditions, and both contain aerobic and facultative anaerobic species (Stieglmeier et al., 2009). These colonies are spherical, opaque, butyrous or yellow-orange, growing at temperatures varying between 20 and 45°C (Schleifer et al., 1979; Collins et al., 1983). The similar morphological and biochemical characteristics of the two genera might have contributed to its initial identification as *Staphylococcus*. Similar results were reported by Elmaci et al. (2015), who observed a divergence in identification at the species level for 53.3% (81/152) of the tested lactic

- (2016). Nosocomial bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins, Finland, 1999-2013: Trends, patient characteristics and mortality. *Infect. Dis. (Lond)*. 48:229-234.
- Melo RCA, Barros EM, Loureiro NG, de Melo HR, Maciel MA, Lopes AC (2014). Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. *Curr. Microbiol.* 69:824-831.
- Murray EC, Marek A, Thomson PC, Coia JE (2015). Gram-negative bacteraemia in haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 30(7):1202-1208.
- Páll E, Niculae M, Kiss T, Şandru CD, Spînu M (2013). Human impact on the microbiological water quality of the rivers. *J. Med. Microbiol.* 62:1635-1640.
- Patel CB, Shanker R, Gupta VK, Upadhyay RS (2016). Q-PCR based culture-independent enumeration and detection of *Enterobacter*: an emerging environmental human pathogen in riverine systems and potable Water. *Front. Microbiol.* 7:172.
- Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, Guerrero-Barrera AL (2015). Waterborne pathogens: Detection methods and challenges. *Pathogens* 4(2):307-334.
- Rodrigues JDD, Jorge AOC, Ueno M (2009). Avaliação da qualidade das águas de áreas utilizadas para recreação do Rio Piracicama-SP. *Revista Biotécnicas*. 15:88-94.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory; 3 ed.
- Schleifer KH, Meyer SA, Rupprecht M (1979). Relatedness among coagulase-negative staphylococci: Deoxyribonucleic acid reassociation and comparative immunological studies. *Arch. Microbiol.* 122:93-101.
- Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY (2012). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *Lancet Infect. Dis.* 12:881-887.
- Skariyachan S, Lokesh P, Rao R, Kumar AU, Vasist KS, Narayanappa R (2013). A pilot study on water pollution and characterization of multidrug-resistant superbugs from Byramangala tank, Ramanagara district, Karnataka, India. *Environ. Monit. Assess.* 185:5483-5495.
- Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, Nadarajan R, Brodie EL, Lynch SV (2015). Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE* 10:e0117617.
- Stieglmeier M, Wirth R, Kminek G, Moissl-Eichinger C (2009). Cultivation of Anaerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria from Spacecraft-Associated Clean Rooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(11):3484-3491.
- Tajbakhsh E, Tajbakhsh S, Khamesipour F (2015). Isolation and molecular detection of Gram negative bacteria causing urinary tract infection in patients referred to Shahrekord hospitals, Iran. *Iran Red Crescent Med. J.* 17(5):e24779.
- Tanchou V (2014). Review of Methods for the Rapid Identification of Pathogens in Water Samples—ERNCIP Thematic A = π^2 Chemical & Biological Risks in the Water Sector—Task 7, Deliverable 1. Institute for the Protection and Security of the Citizen Publications Office of the European Union, <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC92395/lbna26881enn.pdf>.
- USGS-Science for a Changing World (2015). The Effects of Urbanization on Water Quality: Waterborne Pathogens. <http://water.usgs.gov/edu/urbanpath.html>.
- Walker RI, Steele D, Aguado T, Ad Hoc ETEC Technical Expert Committee (2007). Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. *Vaccine* 25:2545-2566.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- WHO (2014). Water Sanitation and Health. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases.
- WHO and UNICEF (2015). Lack of sanitation for 2.4 billion people undermining health improvements. <http://www.unicef.org/mz/en/unicef-who-lack-of-sanitation-for-2-4-billion-people-undermining-health-improvements>.
- Wijetunge DS, Gongati S, DebRoy C, Kim KS, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Kariyawasam S (2015). Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing *Escherichia coli* (NMEC). *BMC Microbiol.* 15(1):211.
- Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:908-934.

3.2 *IN VITRO* EVALUATION OF MERCURY (Hg²⁺) EFFECTS ON BIOFILM FORMATION BY CLINICAL AND ENVIRONMENTAL ISOLATES OF *Klebsiella pneumoniae*

Ecotoxicology and Environmental Safety 169 (2019) 669–677



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv



In vitro evaluation of mercury (Hg²⁺) effects on biofilm formation by clinical and environmental isolates of *Klebsiella pneumoniae*



Lívia Caroline Alexandre de Araújo^a, Antônio Fernando da Purificação-Júnior^b,
Sivoneide Maria da Silva^a, Ana Catarina Souza Lopes^c, Dyana Leal Veras^d, Luiz Carlos Alves^d,
Fábio Brayner dos Santos^d, Thiago Henrique Napoleão^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a,
Márcia Vanusa da Silva^a, Maria Luiza Vilela Oliva^c, Maria Betânia Melo de Oliveira^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil

^b Departamento de Virologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brazil

^c Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil

^d Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brazil

^e Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Heavy metal
Biofilm
Co-resistance
Genetic diversity

ABSTRACT

The increase in urbanization and industrialization has contributed to the contamination of different environments by means of xenobiotic compounds, such as heavy metals, causing changes in microbial communities. Among these metals, the Mercury (Hg²⁺) is one the most prevalent toxic metals for the environment. The present study aimed to evaluate the effect of mercury on the formation of biofilm by environmental (collected from urban stream water) and clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. In addition, antibiotic resistance, virulence factors, and genetic diversity were investigated. Taxonomic identity of eight isolates (one reference, two clinical, and five environmental isolates) was performed by MALDI-TOF-MS, while the antibiotic susceptibility profile was assessed by the disc diffusion method. The ability to form biofilms was evaluated by culture on Congo red agar and by crystal violet staining. Biofilm structure was analyzed by scanning electron microscopy. The hydrophobicity profile and the presence of the virulence genes *cps*, *fimH*, and *mrkD* was investigated. The presence of *merA* and its relationship with antimicrobial resistance were also assessed. The identity of all isolates was confirmed by MALDI-TOF-MS, and different profiles of resistance to mercury and antibiotics as well as of biofilm formation were identified for the clinical and environmental isolates. All isolates were hydrophilic and positive for the virulence genes *cps*, *fimH*, and *mrkD*; only the clinical isolate K36-A2 was positive for *merA*. The diversity of the isolates was confirmed by ERIC-PCR, which revealed high heterogeneity among the isolates. In conclusion, the data demonstrate that the investigated isolates present different responses to exposure to Hg²⁺ and correspond to distinct populations of *K. pneumoniae* disseminated in the investigated environment. The data obtained in this work will aid in understanding the mechanisms of survival of this pathogen under adverse conditions.

1. Introduction

Heavy metals derived from numerous sources participate in the global ecological cycle and can be transported dynamically through the atmosphere, soil, and water. Because they are not biodegradable, these minerals can remain in the environment for long periods of time (Linde et al., 1996). In the last decades, the increase in urbanization and industrialization has contributed to the presence and permanence of these contaminants in the environment. This increase may lead to modifications in the structure and function of microbial communities. (Dixit

et al., 2015; Fashola et al., 2016; Mahbub et al., 2017a, 2017b, 2017c). The survival of bacteria in the presence of heavy metals is linked to the ability of developing mechanisms that neutralize the toxicity by cross-resistance and/or co-regulation of resistance pathways (Aslam et al., 2018; Li et al., 2017; Martins et al., 2014; Yamnina et al., 2012).

Mercury (Hg²⁺) is one the most prevalent toxic metals for the environment. It may be emitted by several natural and anthropogenic sources and is recalcitrant to biodegradation, thus impacting the ecosystem and human health (Barkay et al., 2003; Jan et al., 2016; Mahbub et al., 2016; Mahbub et al., 2018). Bacteria resistant to mercury have

* Corresponding author.

E-mail address: maria.bmoliveira@ufpe.br (M.B.M. de Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.036>

Received 29 June 2018; Received in revised form 5 November 2018; Accepted 9 November 2018

0147-6513/ © 2018 Published by Elsevier Inc.

been found in different environments such as soils (Mahbub et al., 2017a, 2017b, 2017c), sediments (Wu et al., 2016), water (Jan et al., 2016), and, more recently, in clinical samples (Pérez-Valdespino et al., 2013; Yang et al., 2018).

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative bacterium associated with numerous cases of opportunistic respiratory and urinary tract infections in immunocompromised patients (Ahmad and Abulhamd, 2015; Li et al., 2014). In contrast to other bacterial pathogens, this species is ubiquitous and occupies a diversity of niches in nature, including environmental sources (e.g. vegetation, soil, and water), as well as mucosal surfaces and the intestinal tract of humans and animals (Barati et al., 2016; Struve; Krogfelt, 2004).

Some studies have shown that *K. pneumoniae* isolates of environmental origin are highly similar to clinical isolates regarding phenotypic and some genetic features (Barati et al., 2016; Podshun Ullmann, 1993). On the other hand, other studies demonstrate differences between these two groups in relation to virulence factors (Davis et al., 2015; Runcharoen et al., 2017).

Several factors are associated with the virulence of *K. pneumoniae* isolates: lipopolysaccharides, iron uptake system, fimbrial and non-fimbrial adhesins, and polysaccharide capsules (Brisse et al., 2009; Podschun and Ullmann, 1998). Most of them are related to bacterial adhesion to various biotic and abiotic surfaces and, consequently, to the ability of isolates to form biofilms (Murphy et al., 2013; Stahlhur et al., 2012).

Microbial biofilms are complex structures formed by aggregates of microorganisms adhering to a surface, surrounded by a matrix of exopolysaccharides (EPS). Biofilm formation is an effective strategy for microbial survival and persistence under different physicochemical stress and may involve regulatory processes that indirectly activate genetic and biochemical pathways related to the response to exposure to antibiotics and heavy metals (Azevedo and Cerca, 2012). Studies have shown that sub-inhibitory concentrations of antimicrobials may induce biofilm formation (Kaplan et al., 2012; Hennequin et al., 2012). Similarly, several studies have reported the increase in biofilm formation in the presence of different metals, such as lead (Giovannella et al., 2017), cadmium (Wu et al., 2015), nickel (Perrin et al., 2009).

Yang et al. (2018) have emphasized the effect of heavy metals on biofilm formation by bacteria of environmental and/or clinical origin. The aim of this study was to evaluate the effect of Hg^{2+} on biofilm formation by clinical and environmental isolates of *K. pneumoniae*, as well as to verify their resistance, virulence characteristics, and genetic diversity.

2. Materials and methods

2.1. *K. pneumoniae* isolates and culture conditions

Eight isolates were used in the present study, five of which were isolated from water samples collected at different points along an urban stream at Recife, Pernambuco, Brazil (Purificação-Junior et al., 2017), and two of which were clinical isolates (K5-A2 and K36-A2), according Melo et al. (2014), obtained from the Bacterial Culture Collection of the Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). In addition, one isolate (UFPEDA396) obtained from the Microorganism Culture Collection of the Departamento de Antibióticos of UFPE was used as a reference. All isolates were stored in glycerol broth at $-80^{\circ}C$ and re-activated in brain heart infusion (BHI) medium (Difco, Difco Laboratórios Ltda, Brazil) at $37^{\circ}C$ for 24 h.

2.2. Identification by MALDI-TOF

Bacterial cultures grown in BHI medium for 24 h were resuspended in deionized water and inactivated, and proteins were extracted as described by Starostin et al. (2015). For mass spectra analysis, 1 μ L of

the protein extract was placed on a plate (96 MSP, Bruker Daltonics, Billerica, MA USA), followed by drying at room temperature. The alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg/mL) matrix in 50% (v/v) acetonitrile and 0.3% (v/v) trifluoroacetic acid was applied to the plate containing the samples for crystallization. Spectra were read in positive linear mode (acceleration voltage of 20 kV and m/z detection range of 2,000–20,000) using the software Flex Control, version 3.0, and a MALDI-TOF Autoflex III spectrometer (Bruker Daltonics). The spectra obtained were compared with those in the MALDI Biotyper database, version 3.1.

2.3. Antibiotic resistance profile

The bacterial isolates were tested for susceptibility to fifteen antimicrobial agents: ampicillin (10 μ g), cefazolin (30 μ g), cefepime (30 μ g), cefotaxime (30 μ g), ceftioxin (30 μ g), cefuroxime (30 μ g), meropenem (10 μ g), imipenem (10 μ g), gentamicin (10 μ g), amikacin (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), nalidixic acid (30 μ g), tetracycline (30 μ g), chloramphenicol (30 μ g), and nitrofurantoin (300 μ g), trimethoprim (5 μ g). The experiments were performed in triplicate using the Kirby-Bauer method (disc diffusion), as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2017).

2.4. Evaluation of biofilm formation by Congo red agar assay

The ability to produce biofilms was analyzed by the method described by Freeman et al. (1989). In this assay, the behavior of colonies in sterile Congo red agar (CRA) medium, composed of 37 g/L of BHI medium, 50 g/L of sucrose, 15 g/L of base agar, and 0.8 g/L of Congo red (all purchased from Difco, Difco Laboratórios Ltda, Brasil), was analyzed. The isolates were seeded onto the CRA medium by streaking technique, incubated at $37^{\circ}C$ for 24 h, and then left at room temperature for another 18 h. The results were interpreted according to the staining presented by the colonies after the incubation period: biofilm-producing colonies showed black coloration, while non-biofilm producers showed red coloration. The experiment was performed in triplicate, and three independent assays were performed.

2.5. Biofilm quantification assay

Biofilm quantification was performed in 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plates (Costar, Corning, NY, USA) tryptose soy broth (TSB) medium, and incubation at $37^{\circ}C$ for 24 h. The plates were incubated at $37^{\circ}C$, and, after 24 h, the supernatants were discarded and the wells washed three times with 0.85% saline. The biofilm formed was stained by crystal violet and quantified by reading the OD at 570 nm.

The mean absorbance value of each sample (ODs) was determined in comparison with the absorbance of the sterility control (ODc). The samples were classified as strong ($4 \times ODc < ODs$), moderate ($2 \times ODc < ODs \leq 4 \times ODc$) or weak ($ODc < ODs \leq 2 \times ODc$) biofilm formers. The isolates that presented absorbance values equal to or lower than the control value were classified as non-biofilm producers.

2.6. Hydrophobicity profile

Cell surface hydrophobicity (CSH) was evaluated based on the hydrocarbon binding method of the Tendolkar et al. (2004), substituting the hydrocarbon hexadecane for xylene. Isolates grown in BHI broth at $37^{\circ}C$ for 18 h were transferred to microtubes and centrifuged for 10 min at 7000 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in PUM buffer (tri-hydrate and monobasic potassium phosphate, urea, and heptahydrate magnesium sulphate), adjusted to 0.5 the initial reading (ODi) at 600 nm was recorded. Subsequently, para-xylene was added to the bacterial suspensions, followed by vortexing for 2 min. After separation of the phases at room temperature,

Table 1
Primers used for PCR and DNA sequencing.

Gene	Primer	Sequence	Annealing temperature	Amplicon size (bp)	References
<i>cps</i>	<i>cpq</i>	5'CTCCCAATTGTGACCGAAATC 3'	61 °C	435	Hennequin et al. (2012)
	<i>cpqprev</i>	5'GCTCGGGGCAACAGCTGA 3'			
<i>fimH</i>	<i>fimT1-F</i>	5'CGTTATATTTCACGGTGCC 3'	59 °C	1200	Abou-Shanab et al. (2007)
	<i>fimT1-R</i>	5' TCTACGTAACTGACCCCG 3'			
<i>mrkD</i>	<i>mrkD-2F</i>	5'CAACCACTATTCCTCGAA 3'	62 °C	226	Chang et al. (2006)
	<i>mrkD-2R</i>	5'ATGGAAGCCACATGACATT 3'			
<i>merA</i>	<i>merA-F</i>	5'GAGATCTAAAGCAGGCTAAGGC 3'	57 °C	1011	Misra et al. (1984)
	<i>merA-R</i>	5'GGAATCTTGACTGTGATCGGG 3'			
ERIC	<i>ERIC-R1</i>	5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC 3'	36 °C	–	Duan et al. (2009)
	<i>ERIC-R2</i>	5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'			

the final optical density (OD_f) at 600 nm of the lower phase of each microtube was read. To determine the CSH (%), the following formula was used: CSH (%) = (OD_i - OD_f) / OD_i × 100. Bacteria that had a CSH (%) lower than 30% were considered hydrophilic, and those with a CSH higher than 70% were considered hydrophobic. Samples that had a CSH between 30% and 70% were classified as moderately hydrophobic.

2.7. Quantification of mercury in the environment

To verify the presence or absence of the metal in the investigated environment samples of water and sediment were collected and analyzed according to the recommendations of the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). The results were interpreted according to the concentration limits set forth in Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolution No. 454 (BRASIL, 2012).

2.8. Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of mercury

The determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of Hg²⁺ was performed by the microdilution technique in 96-well microplates, as recommended by the CLSI (CLSI, 2017). The isolates were inoculated in Tryptic Soy Broth (TSB) medium containing mercury chloride (HgCl₂), at concentration of 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/mL. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, and growth was assessed by reading the OD at 600 nm. The experiment was performed in quadruplicate, and three independent assays were performed.

2.9. Effect of mercury on biofilm formation

The effect of Hg²⁺ on biofilm formation was evaluated by the method described by Wu et al. (2015), with some modifications. The bacterial suspension (10⁶ CFU/mL) was transferred to a 96-well polystyrene microplate, into which TSB medium containing mercury at sub-inhibitory concentrations was added. The incubation and the steps occurred according to the topic 2.5.

2.10. Scanning electron microscopy (SEM) studies

For analyzing the structure of the biofilm in the presence and absence of mercury, the isolates were submitted to the same conditions mentioned in Section 2.8 but including catheter fragments in the wells of the microplate. The samples were washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and fixed in 0.1 M phosphate buffer containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde. Post-fixation was performed in 1% osmium tetroxide, in 0.1 M phosphate buffer, for 90 min. Three washes were then performed in 0.1 M phosphate buffer for dehydration using increasing ethanol dilutions: 30%, 50%, 70%, 90%, and three times in 100%, 10 min for each step. After the dehydration, the critical point for the substitution of ethanol with carbon dioxide was obtained, drying the

material for assembly in metallic stubs using a double carbon tape. The metallization was performed by covering the material with a thin layer of gold for visualization under the scanning electron microscope JEOL JSM-5600 LV.

2.11. DNA extraction and amplification of the genes *cps*, *fimH*, *mrkD*, and *merA*

Total DNA extraction was performed using the PureLink[®] kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The amplification reactions were performed using a total volume of 25 µL per tube, each containing 20 ng genomic DNA, 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 200 µM of each dNTP (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂, 15 pmol of the primers, and 1 × PCR buffer (Invitrogen). The amplifications were performed in a thermal cycler (C1000 Thermal Cycler –

BioRad) using the following program: 5 min at 96 °C for initial denaturation, followed by 35 cycles, each consisting of 1 min at 96 °C for denaturation, 1 min at a specific temperature for each primer (Table 1) and 1 min at 72 °C for extension. Next, a final, stretching step of 10 min at 72 °C was performed. Amplification products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis in TBE buffer.

2.12. Purification and sequencing of *cps*, *fimH*, *mrkD*, and *merA*

The amplified gene products were purified following the PureLink purification kit protocol (Invitrogen) and then sequenced in an ABI 3100 automatic DNA sequencer, in Sequencing Platform of the Federal University of Pernambuco. The obtained sequences were processed by Staden and MEGA 5.0 programs and compared to other sequences deposited in the NCBI GenBank database using the tool Standard Nucleotide BLAST (BLASTN) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

2.13. ERIC-PCR

For amplification of ERIC sequences by PCR, the oligonucleotide primer ERIC-R1 (Duan et al., 2009) was used. The reaction mixtures contained 1.52 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 40 pmol/µL of each primer, 1 U Taq DNA Polymerase, 1 × reaction buffer, and 100 ng DNA, in final volume of 25 µL. The amplification was performed in a thermal cycler, programmed with an initial cycle of 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 1 min at 92 °C, 1 min at 36 °C, and 8 min at 72 °C and by a final extension step of 16 min at 72 °C. The quality of the amplified products was analyzed on 1.5% agarose gel using the 1 kb Plus DNA Ladder marker. The dendrogram was constructed by the NTSYS-pc software (Numerical Taxonomy System, Version 2.0) from a binary matrix, based on the presence or absence of bands.

2.14. Statistical analysis

The experiments to determine the minimum inhibitory

Table 2
Characterization of the bacterial isolates: identification by MALDI-TOF-MS, antibiotic resistance profiles, biofilm formation ability, minimal inhibitory concentration (MIC) of mercury (Hg^{+2}), hydrophobicity profile, and the presence of virulence genes and of mercury.

Isolates	Source of isolation	MALDI-TOF Identification	Score Value MS	MALDI-TOF	Antibiotic resistance	MIC Hg^{+2} ($\mu g/mL$)	Hydrophobicity	Presence of genes
F2P2A	Cavouco stream (Point 2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2146		AMP, TET, TRI	25	Hydrophilic	<i>qps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
F1P3C	Cavouco stream (Point 3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2064		AMP, TET, TRI	25	Hydrophilic	<i>qps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
F2P3C	Cavouco stream (Point 3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2104		AMP	25	Hydrophilic	<i>qps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
F2P3A	Cavouco stream (Point 3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2136		AMP, TET, TRI	12.5	Hydrophilic	<i>qps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
F2P4A	Cavouco stream (Point 4)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2155		AMP	12.5	Hydrophilic	<i>qps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
UFPEDA396	Reference strain	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2146		AMP, CPM, CRX, CFI, MER, CFZ, TRI, IMP, CPO, CTX, NIT	12.5	Hydrophilic	<i>qps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
K5-A2	Rectal swab	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2364		(1)	25	Hydrophilic	<i>qps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
K36-A2	Urethral secretion	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2410		AMP, CFZ, CPM, CRX, CFI, MER, CFZ, TRI, CPO, CTX, NIT, GEN, NAL, CFL	50	Hydrophilic	<i>qps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i> , <i>merA</i>

AMP, Ampicillin; TET, Tetracycline; TRI, Trimethoprim; CPM, Cefepime; CRX, Cefuroxime; CFI, Cefalotaxime; MER, Meropenem; CFZ, Cefazolin; IMP, Imipenem; CPO, Cefoxitin; CTX, Cefotaxime; NIT, Nitrofurantoin; GEN, Gentamicine; NAL, Nalidixic acid. MO: moderate former. ST: strong former; virulence gene: *qps*, *fimH*, *mrkD*; metal gene: *merA*.

concentration of the mercury and formation of biofilm in the absence and presence of this metal were performed in quadruplicate and in three independent assays. The results were presented as mean values $\pm$ the standard deviations (SD). Statistical analyses were performed by the ANOVA test and Student's *t*-test, using GraphPad Prism software.

3. Results

The identity of all isolates was confirmed as belonging to *K. pneumoniae* by MALDI-TOF. Score values varied between 2.104 and 2.410, indicating a high species compatibility level (Table 2). All environmental isolates were obtained from an impacted urban stream that presented values of 0.24 mg/kg of mercury in previous analyses (unpublished data).

Distinct resistance profiles were observed between the environmental and clinical isolates. Among the environmental isolates, two (F2P3C and F2P4A) presented resistance only to ampicillin, similar to that observed for the reference isolate UFPEDA396. The others (F2P2A, F1P3C, and F2P3A) were resistant to this antimicrobial as well as to tetracycline and trimethoprim. The clinical isolates presented a broader resistance profile, being resistant to multiple antibiotics of different classes. K5-A2 was resistant to 10 antimicrobials, while K36-A2 was resistant to 12 of the 15 antimicrobials tested (Table 2).

All isolates were able to form biofilms on Congo red agar. According to crystal violet staining, the environmental isolates F2P2A, F1P3C, and F2P3C and the clinical isolate K5-A2 were classified as moderate biofilm formers, while the others were strong biofilm formers. In addition, all isolates were considered hydrophilic, with CSH values of < 30%, and were positive for *qps*, *fimH*, and *mrkD* (Table 2); only the clinical isolate K36-A2 was positive for *merA*.

To assess the tolerance of the isolates to mercury, the MICs were determined. Mercury chloride presented a MIC value of 12.5 $\mu g/mL$ for UFPEDA396, F2P4A, and F2P3A and 25 $\mu g/mL$ for F2P2A, F1P3C, F2P3C, and K5-A2. A MIC value of 50 $\mu g/mL$ was found obtained for the clinical isolate K36-A2 (Table 2).

In addition, biofilm formation in the absence and presence of mercury was evaluated. All isolates showed different responses at sub-inhibitory concentrations (Fig. 1). An increase in biofilm formation of 70% and 42% was observed in treatments of UFPEDA396 with 6.25 and 3.125 $\mu g/mL$ of mercury chloride, respectively. Biofilm formation by F1P3C increased by 79%, 62%, and 53% at mercury chloride concentrations of 12.5, 6.25, and 3.125 $\mu g/mL$, respectively. However, the presence of mercury chloride did not significantly alter the biofilm formation of F2P2A and F2P3A. On the other hand, there was a 26% reduction in biofilm formation by F2P4A in the presence of 6.25 $\mu g/mL$ of mercury chloride, differentiating this isolate from the other environmental isolates. Among the clinical isolates, K36-A2 presented a 20% increase in biofilm formation after treatment with 12.5 $\mu g/mL$ of mercury chloride, whereas the biofilm formation by the K5-A2 suffered a 35% reduction at this same concentration of mercury chloride.

Among the isolates studied, three (UFPEDA396, F2P3A, and K36-A2) were selected for evaluation of biofilm structure by SEM in the absence (control) and in the presence of mercury at the concentration of 1/2 MIC (Fig. 2). Among the isolates investigated, it was observed that in the absence of the metal, the clinical isolate was the largest biofilm producer (Fig. 2E), while in the control presence (UFPEDA396), Fig. 2B. The results demonstrate that, in the absence of the metal, UFPEDA396 cells adhered strongly, with little extracellular matrix being observed (Fig. 2A). After exposure to mercury, the production of intense amounts of matrix was observed, indicating an increase in biofilm formation (Fig. 2B). No morphological changes in the cells were detected when treating the environmental isolate F2P3A with the metal; however, an increased amount of matrix was observed (Fig. 2D). The clinical isolate K36-A2 formed biofilm in the absence of mercury, with cells adhering to the surface and producing matrix; in the presence of mercury, a

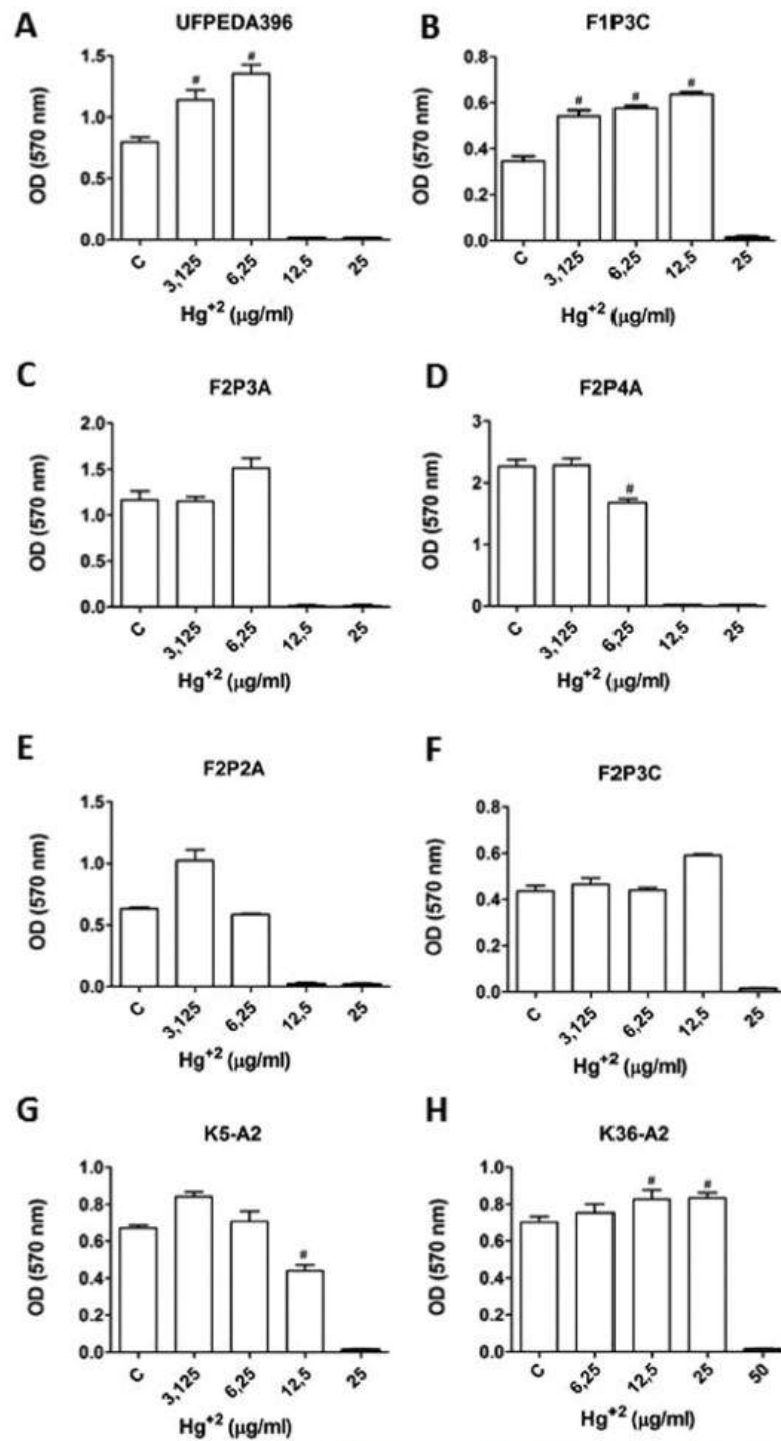


Fig. 1. Biofilm formation in the presence of mercury by reference (UFPEDA396), environmental (F2P2A, F1P3C, F2P3C, F2P3A, and F2P4A), and clinical (K5-A2 and K36-A2) isolates of *K. pneumoniae*. C: Control (absence of metal). # $p < 0.05$ compared to control.

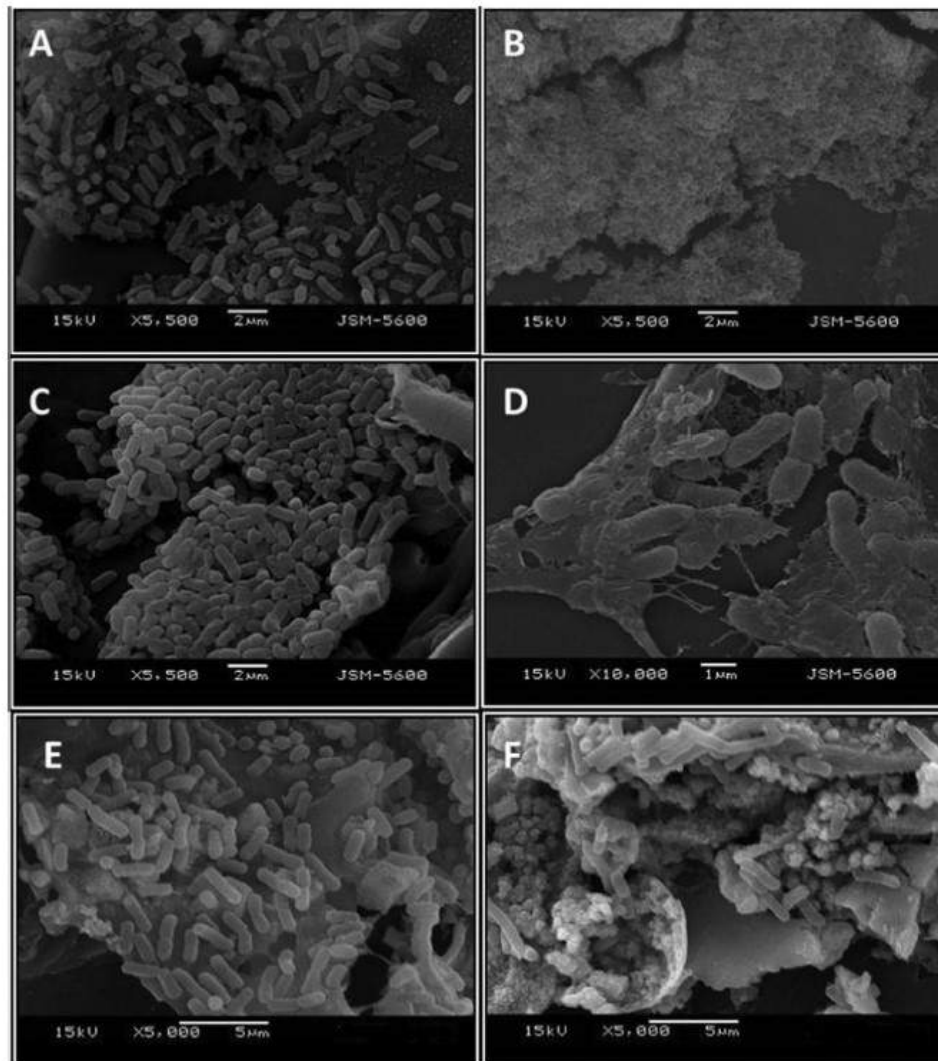


Fig. 2. Scanning electron microscopy image of biofilm formed in the presence and absence of mercury (Hg^{2+}) by isolates of *K. pneumoniae*. A – UFPEDA396 in absence of mercury (control); B – UFPEDA396 exposed to mercury at 6.25 $\mu\text{g/mL}$. C – F2P3A control; D – F2P3A exposed to mercury at 12.5 $\mu\text{g/mL}$; E – K36-A2 control; F – K36-A2 exposed to mercury at 25.0 $\mu\text{g/mL}$.

significant increase in extracellular matrix production was observed (Fig. 2E, F).

Using ERIC-PCR, different profiles were verified for all the isolates investigated, and the results showed a maximum similarity of approximately 50%, confirming the diversity among the isolates (Fig. 3).

4. Discussion

Confirmation of the taxonomic identity is often used to characterize microorganisms. The MALDI-TOF technique is a viable alternative for this purpose, since it is capable of generating single mass spectra for each microorganism analyzed and, therefore, it is considered reliable for the distinction of bacteria at the level of genus and species (Croxatto et al., 2012; Wattal et al., 2016; Sharma et al., 2017).

Distinct resistance profiles were observed for clinical and environmental isolates. Similar data are found in the literature and demonstrate that these profiles are related to the selective pressure in each environment (Runcharoen et al., 2017). The aquatic environment is considered efficient for the establishment of resistant bacterial populations, since it is prone to changes that exert a selective pressure, as well as constituting a medium for the dissemination of antimicrobial resistance genes (Woodford et al., 2014). However, the selective pressure seems to be lower than that found in hospital environments due to the therapeutic practice performed in clinics

(Runcharoen et al., 2017). It is possible to observe intrinsic resistance, which is present in bacteria independent of the selection pressure suffered or the environment. In the present work, all the clinical and environmental isolates were resistant to ampicillin,

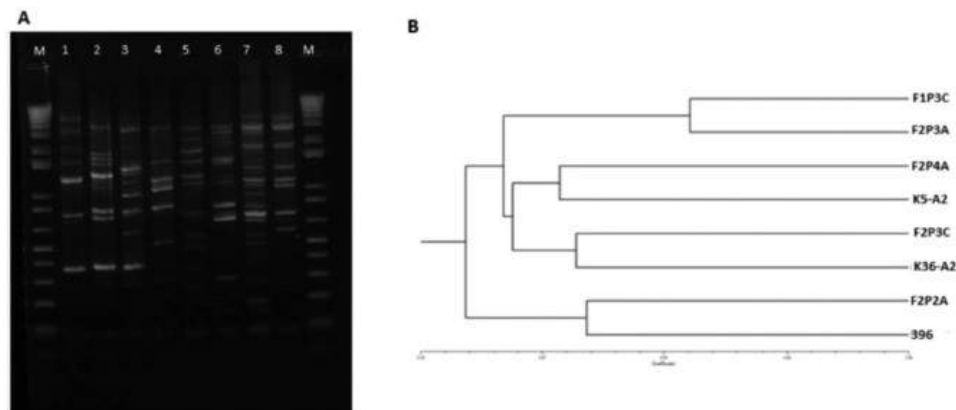


Fig. 3. Genetic diversity of *K. pneumoniae* isolated by ERIC-PCR. (A) Electrophoresis of PCR products. (B) Dendrogram of similarity generated by the NTSYS 2.0 software. M: Molecular marker; 1: F1P3C; 2: F2P3A; 3: F2P4A; 4: F2P2A; 5: F2P3C; 6: UPPEDA396; 7: K36-A2; 8: K5-A2.

corroborating data from the literature, indicating that this is an intrinsic characteristic of the genus *Klebsiella*, linked to the expression of β -lactamases encoded by chromosomal DNA (Struve et al., 2004; Melo et al., 2014). Resistance to tetracycline and trimethoprim was observed in the environmental isolates, which they possibly acquired in the impacted environment. Therefore, it can be concluded that the impacted environment also exerts a selective pressure on environmental bacterial isolates.

All *K. pneumoniae* isolates were classified as hydrophilic and showed to be moderate or strong biofilm formers. These data corroborate the study by Czerwonka et al. (2016), in which the authors correlate a low CSH with high capacity of biofilm production. External bacterial structures such as flagella, fimbriae, and capsules, are also important factors for the formation of biofilms (Ribeiro et al., 2016; Murphy et al., 2013). In *K. pneumoniae*, the polysaccharide capsule and fimbriae are structural components of the cell surface that play important roles in the survival and pathogenicity of this species, being related to adhesion to various surfaces and biofilm formation (Ribeiro et al., 2016). In the present study, the presence of the virulence genes *cps*, *fimH*, and *mrkD*, which codify the polysaccharide capsule and fimbriae types 1 and 3, was identified in all isolates, confirming their potential for biofilm formation, as well as their pathogenic potential.

The relationship between resistance to antimicrobials and heavy metals has been extensively discussed in the literature (Hahn et al., 2015; He et al., 2017). Bacteria develop some mechanisms to neutralize the toxicity of mercury, such as the enzymatic reduction of the mercuric ion (Hg^{2+}) to the volatile and less toxic elemental mercury (Hg^0). This reduction is catalyzed by the enzyme cytosolic mercury reductase (MerA), encoded by a *merA* gene belonging to the *mer* operon.

Studies have shown a frequent association between the *mer* operon and antimicrobial resistance (Baker-Austin et al., 2006; Mathema et al., 2011). Yang et al. (2018), when evaluating the association between heavy metal resistance genes and antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae, found that MIC values of mercury showed were higher for clinical isolates of *K. pneumoniae* positive for *merA*. In addition, a high frequency of antimicrobial resistance genes in these isolates was observed. Pérez-Valdespino et al. (2013) demonstrated that several clinical isolates of *Aeromonas* sp. that presented *merA* were resistant to different antibiotics such as tetracycline, trimethoprim, nalidixic acid, and streptomycin. Among the isolates tested in the present study, the clinical isolate K36-A2 was resistant to the highest number of antimicrobials, and the MIC value of mercury was four times higher than that of other isolates. In addition, this isolate was identified as the only carrier of *merA*, being in accordance with data from the literature

and suggesting a common mechanism of resistance to mercury and the antimicrobials tested.

Some studies have reported an increase in biofilm formation in the presence of different metals, such as nickel (Perrin et al., 2009), cadmium (Wu et al., 2015), and lead (Giovannella et al., 2017), among others. Giovannella et al. (2017) evidenced an increase in biofilm formation by a *Pseudomonas* sp. isolate in the presence of mercury (Hg^{2+}), being in line with our results, which showed a significant increase in biofilm production by most of the isolates at different sub-inhibitory concentrations of mercury. However, other studies have shown that, depending on the metal and its concentration, biofilm formation may be reduced (Conibe et al., 2013; Navarrete and De La Fuente, 2014), which we also observed in the case of isolates F2P4A and K5-A2 at concentrations of mercury of 6.25 and 12.5 $\mu g/mL$, respectively. These differences may be related to the fact that the effects of metals depend on their concentration and speciation (Jomova, Valko, 2011; Lemire et al., 2013; Wu et al., 2015), growth conditions, and intrinsic characteristics of the bacterial isolate (Booth et al., 2013; Tremarolli et al., 2008), demonstrating the bacteria response to stress. In *Pseudomonas pseudoalcaligenes* it was observed a divergence in the capacity of biofilm formation in different specimens (Booth et al., 2013).

A bacterial biofilm is usually embedded in a matrix of extracellular polymeric substance (EPS) (Flemming and Wingender, 2010; Sutherland, 1990), whose production is influenced by environmental factors, such as temperature, pH, medium composition, and concentration of heavy metals, among other factors (Mohite et al., 2017). Microorganisms respond to the presence of metals through several intrinsic mechanisms, among them the production of EPS. EPS acts as a protective layer against heavy metals either by binding metal ions or by delaying their diffusion into the biofilm (Pal and Paul, 2008). Sheng et al. (2010) demonstrated that heavy metals stimulate the production of EPS by *Rhodopseudomonas acidophila*, which is in line with our results, wherein an increase of EPS in biofilm formation was observed when exposing the bacteria to the action of Hg^{2+} , as visualized by SEM.

To prove the genetic diversity among the different isolates of *K. pneumoniae*, ERIC-PCR was used. ERIC sequences are located in extragenic regions of the bacterial genome and have been used for the characterization of bacteria because they are highly conserved. El-Badawy et al. (2017) demonstrated the efficacy of this technique for genotyping clinical isolates of *K. pneumoniae* obtained from different sources. Wasfi et al. (2016) compared this technique with RAPD and indicated that ERIC-PCR was more effective in the differentiation of the isolates and correlation with resistance profiles and virulence factors of *K. pneumoniae*. Additionally, Seifi et al. (2016) showed that ERIC-PCR

was efficient in detecting heterogeneity among isolates of this species. These works support our findings, confirming the genetic diversity detected for the isolates studied.

The ability of microorganisms to survive under stress conditions, such as the presence of heavy metals, depends on structural and biochemical attributes, as well as on physiological and/or genetic adaptations (Abou-Shanab et al., 2007). The results described in this study demonstrated the potential for adaptation and survival of *K. pneumoniae* isolates and demonstrate the importance of monitoring impacted aquatic environments, as they may harbor and disseminate bacterial pathogens.

5. Conclusion

The present study revealed that Hg^{2+} can act as a stress factor for clinical and environmental isolates of *K. pneumoniae*, stimulating biofilm formation. The observed phenotypic differences are supported by the different genetic profiles, indicating the presence of distinct bacterial populations in the analyzed ecosystem. These are the first data on the effect of mercury on clinical and environmental isolates of *K. pneumoniae* and will aid in understanding the mechanisms of survival of this pathogen under adverse conditions.

Acknowledgements

We thank the Coordination for Improvement of CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) Brazilian agency and the FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) for funding this study.

References

- Abou-Shanab, R.A.L., Van Berkum, P., Angle, J.S., 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68, 360–367.
- Ahmad, S., Abulhamd, A., 2015. Phenotypic and molecular characterization of nosocomial *K. pneumoniae* isolates by ribotyping. *Adv. Med. Sci.* 60 (1), 69–75.
- APHA, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 22nd Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Aslam, F., Yasmin, A., Thomas, T., 2018. Essential gene clusters identified in *Serratia marcescens* MB339 for multiple metal/antibiotic resistance and xenobiotic degradation. *Curr. Microbiol.* 75 (11), 1484–1492.
- Azevedo, N.F., Cerca, N., 2012. Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria, 1. ed. Publindústria Edições Técnicas, Portugal.
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.B., 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 14, 176–182.
- Barati, A., Ghaderpour, A., Chew, L.L., et al., 2016. Isolation and Characterization of Aquatic-Borne *Klebsiella pneumoniae* from tropical estuaries in Malaysia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 426.
- Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O., 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 355–384.
- Booth, S.C., George, L.F.S., Zannoni, D., Cappellotti, M., Duggan, G.E., Ceri, H., et al., 2013. Effect of aluminium and copper on biofilm development of *Pseudomonas pseudocatalinae* KF707 and *P. fluorescens* as a function of different media compositions. *Metallomics* 5, 723–735.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), 2012. Resolução n. 454, de 1 de novembro de 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional.
- Brise, S., Fevre, C., Passet, V., Issenuth-Jeanjean, S., Tournibize, R., Diancourt, L., Grimont, P., 2009. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 4, e4982.
- Chang, B.J., Huang, Y.J., Chan, C.H., Hsu, L., Peng, H.L., Chang, H.Y., Yew, T.R., Liu, C.H., Chi, S., 2006. Measurement of the adhesive force between a single *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbria and collagen IV using optical tweezer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350 (1), 33–38.
- CLSI, 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seven Inform. Supplement - M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Conibe, P.A., Cruz, L.F., Navarrete, F., Ducan, D., Tygart, M., De La Fuente, L., 2013. *Xylella fastidiosa* differentially accumulates mineral elements in biofilm in planktonic cells. *PLoS One* 8, e54936.
- Croxatto, A., Prod'homme, G., 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., et al., 2016. The role of *Proteus mirabilis* cell wall features in biofilm formation. *Arch. Microbiol.*
- Davis, G.S., Waits, K., Nordstrom, L., Weaver, B., Aziz, M., et al., 2015. Intermingled *Klebsiella pneumoniae* populations between retail meats and human urinary tract infections. *Clin. Infect. Dis.* 61, 892–899.
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandey, K., Singh, U.B., et al., 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability* 7, 2189–2212.
- Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., et al., 2009. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ. Res.* 109, 511–517.
- El-Badawy, M.F., Tawakol, W.M., El-Far, S.W., Maghrabi, I.A., Al-Ghamdi, S.A., Mansy, M.S., Ashour, M.S., Shohayeb, M.M., 2017. Molecular Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Patients. *Int. J. Microbiol.* 8050432.
- Fashola, M.O., Ngole-Jeme, V.M., Babalola, O.O., 2016. Heavy metal pollution from gold mines: environmental effects and bacterial strategies for resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 1047.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8.
- Freeman, D.J., Falkner, F.R., Keane, C.T., 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42 (8), 872–874.
- Giovannella, P., Cabral, L., Costa, A.P., et al., 2017. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 140, 162–169.
- Hennequin, C., Aumeran, C., Robin, F., Traore, O., Forestier, C., 2012. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (8), 3710–3713.
- Jan, A.T., Azam, M., Choi, L., Ali, A., Mohd, H., Q.M.R., 2016. Analysis for the presence of determinants involved in the transport of Mercury across bacterial membrane from polluted water bodies of India. *Braz. J. Microbiol.* 47, 55–62.
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol.* 283, 65–87.
- Kaplan, J.B., Lo Vetri, K., Cardona, S.T., Madhyastha, S., Sadoskaya, I., Jabbouri, S., Izano, E.A., 2012. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J. Antibiot.* 65, 73–77.
- Lemire, J.A., Harrison, J.J., Turner, R.J., 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371–384.
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., Zhou, D., 2014. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 9 (9), 1071–1081.
- Li, L., Xia, Y., Zhang, T., 2017. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. *ISME J.* 11, 651–662.
- Linde, A.R., Artibas, P., Sanchez-Galan, S., Garcia-Vazquez, E., 1996. El (Anguilla anguilla) and Brown Trout (*Salmo trutta*) target species to assess the biological impact of trace metal pollution in freshwater ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 297–302.
- Mahbub, K.R., Krishnan, K., Andrews, S., Venert, S., Naidu, R., Megharaj, M., 2017a. Bioaugmentation and nutrient amendment decrease concentration of Mercury in contaminated soil. *Sci. Total Environ.* 576, 303–309.
- Mahbub, K.R., Krishnan, K., Naidu, R., Andrews, S., Megharaj, M., 2017b. Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecol. Indic.* 74, 451–462.
- Mahbub, K.R., Subashchandrabose, S.R., Krishnan, K., Naidu, R., Megharaj, M., 2017c. Mercury alters the bacterial community structure and diversity in soil even at concentrations lower than the guideline values. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2163–2175.
- Mahbub, K.R., Bahar, M., Md, Megharaj, M., Labbate, M., 2018. Are the existing guideline values adequate to protect soil health from inorganic mercury contamination? *Environ. Int.* 117, 10–15.
- Mahbub, K.R., Krishnan, K., Megharaj, M., Naidu, R., 2016. Bioremediation potential of a highly mercury resistant bacterial strain *Sphingobium SA2* isolated from contaminated soil. *Chemosphere* 7, 144–330.
- Martins, V.V., Zanetti, M.O.B., Pitondo-Silva, A., Stehling, E.G., 2014. Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals a human health hazard. *Metal exclusion. Appl. Biochem. Biotechnol.* 17, 2591–2594.
- Mathema, V.B., Thakuri, B.C., Sillanpää, M., 2011. Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Arch. Microbiol.* 193, 837–844.
- Melo, R.C.A.M., Barros, E.M.R., Loureiro, N.G., Melo, H.R.L., Maciel, M.A.V., Lopes, A.C.S., 2014. Presence of *fimH*, *mrkD*, and *irp2* virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. *Curr. Microbiol.* 69, 824–831.
- Misra, T.K., Brown, N., Fritzinger, D.C., Pridmore, R.D., Barnes, W.M., Habestrom, L., Silver, S., 1984. Mercuric ion-resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: the beginning of the operon including the regulatory region and the first two structural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5975–5979.
- Mohite, B.V., Koli, S.H., Narkhede, C.P., Patil, S.V., 2017. Prospective of microbial exopolysaccharide for heavy metal exclusion. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183, 582–600.
- Murphy, C.N., Mortensen, M.S., Krogfelt, K.A., et al., 2013. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Immun.* 81, 3009–3017.
- Navarrete, F., De La Fuente, L., 2014. Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(10), 97–107.
- Pal, A., Paul, A.K., 2008. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48 (1), 49–64.
- Pérez-Valdés, A., Celestino-Mancera, M., Villegas-Rodríguez, V.L., Curiel-Quesada, E., 2013. Characterization of mercury-resistant clinical *Aeromonas* species. *Braz. J. Microbiol.* 44 (4), 1279–1283.

- Perrin, C., Briandet, R., Jubelin, G., Lejeune, P., 2009. Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1723–1733.
- Podschun, R., Ullmann, U., 1993. Bacteriocin typing of environmental *Klebsiella* isolates. *Zent. Hyg. Umweltmed.* 195, 22–26.
- Podschun, R., Ullmann, U., 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (4), 589–603.
- Purificação-júnior, A.F., Araújo, L.C.A., Lopes, A.C.S., et al., 2017. Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health. *Afr. J. Microbiol. Res.* 11, 1142–1149.
- Ribeiro, S.M., Cardoso, M.H., Cândido, E.S., Franco, O.L., 2016. Understanding, preventing and eradicating *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiol.* 10–2217.
- Runcharoen, C., Momdugavand, D., Bane, B., et al., 2017. Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological link between clinical and environmental *Klebsiella*. *Genome Med.* 9, 2–10.
- Seifi, K., Kazemian, H., Heidari, H., et al., 2016. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J. Microbiol.* 9.
- Sheng, G.P., Yu, H.Q., Li, X.Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* 28 (6), 882–894.
- Stahlhut, S.G., Struve, C., Krogfelt, K.A., Reisner, A., 2012. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65 (2), 350–359.
- Starostin, K.V., Demidov, E.A., Bryanskaya, A.V., et al., 2015. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Sci. Rep.* 5, 16989.
- Struve, C., Krogfelt, K.A., 2004. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environ. Microbiol.* 6, 584–590.
- Sutherland, I.W., 1990. *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides* 9 Cambridge University Press.
- Tendolkar, P.M., Baghdadyan, A.S., Gilmore, M.S., Shankar, N., 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 72, 6032–6039.
- Tremaroli, V., Fedi, S., Turner, R.J., Ceri, H., Zannoni, D., 2008. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 upon biofilm formation on a polystyrene surface acquire a Strong antibiotic resistance with minor changes in their tolerance to metal cations and metalloids oxyanions. *Arch. Microbiol.* 190, 29–39.
- Wasfi, R., Elkhatib, W.F., Ashour, H.M., 2016. Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. *Sci. Rep.* 6, 38929.
- Wattal, C., Oberoi, J.K., Goel, N., Raveendran, R., 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.*
- Woodford, N., Wareham, D.W., Guerra, B., Teale, C., 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 287–291.
- Wu, S.M., Liu, G., Jin, W.H., Xiu, O.Y., Sun, C.M., 2016. Antibiofilm and anti-infection of a marine bacterial exopolysaccharide against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 7, 102.
- Wu, X., Santos, R.S., Fink-Gremmels, J., 2015. Cadmium modulates biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 2878–2894.
- Yammina, B., Tahar, B., Laure, M.F., 2012. Isolation and screening of heavy metal resistant bacteria from wastewater: a study of heavy metal co-resistance and antibiotics resistance. *Water Sci. Technol.* 66 (2041–20).
- Yang, Q.E., Agouri, S.R., Tyrrell, J.M., Walsh, T.R., 2018. Heavy metal resistance genes are associated with bla_{NDM-1} and bla_{CTX-M-15} Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (5) (e02642–17).

3.3 APLICABILIDADE DE TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA EM UM RIACHO URBANO IMPACTADO

Aplicabilidade de técnicas para identificação microbiana em um riacho urbano impactado

Livia Caroline Alexandre de Araújo¹, Maria do Carmo Silva Barreto², Ana Carolina de Oliveira Luz⁴, Tereza Cristina Leal-Balbino⁴, Márcia Vanusa da Silva¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹, Maria Luiza Vilela Oliva³, Maria Betânia Melo de Oliveira^{1*}

¹*Departamento de Bioquímica – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.*

²*Instituto de Pesquisa Agronômica – IPA, Pernambuco, Brasil.*

³*Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

⁴*Departamento de Microbiologia - Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães, Pernambuco, Brasil.*

*Autor correspondente: e-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br

RESUMO

O crescente processo de urbanização e seus impactos ambientais têm interferido na dinâmica dos ecossistemas aquáticos, modificando a estrutura e função das comunidades microbianas. A rápida e acurada identificação de microrganismos presentes nesses ambientes é necessária para o monitoramento de mudanças dessas comunidades e para identificar possíveis riscos à saúde pública. O objetivo do presente estudo foi avaliar a aplicabilidade de técnicas na identificação de bactérias isoladas de um riacho urbano contaminado. Amostras de água foram coletadas de cinco pontos estratégicos (P1-P5) do riacho Cavouco onde 50 isolados foram obtidos e caracterizados morfológicamente por meio de características fenotípicas e moleculares através das técnicas de MALDI-TOF-MS e sequenciamento do gene *16S rRNA*. As análises morfológicas revelaram uma uniformidade no formato das colônias e características distintas para os demais parâmetros analisados, não sendo possível, portanto, identificá-las a nível taxonômico, diferentemente das análises moleculares onde 86% dos isolados (n=43) foram identificados ao nível de espécie e 12% (n=7) ao nível de gênero. Nessa caracterização foi verificada uma elevada concordância entre a identificação realizada pelo MALDI-TOF-MS e pelo sequenciamento do gene *16S rRNA*, onde 13 gêneros foram detectados, 4 gram-positivos (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brachybacterium*, *Exiguobacterium*) e 9 gram-negativos (*Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Brevundimonas*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Providencia*); alguns de origem ambiental, outros de origem hospitalar, evidenciando a importância de um constante e eficaz monitoramento da microbiota local. Os resultados obtidos confirmam a eficiência das técnicas moleculares na identificação de microrganismos e sugerem que, apesar de ser direcionada para bactérias de interesse clínico, a técnica MALDI-TOF-MS é uma alternativa rápida e eficaz na identificação de microrganismos de ambiente impactado.

Palavras-chaves: Fenótipo, técnicas moleculares, diversidade.

1. Introdução

Os microrganismos são essenciais para o meio ambiente, pois contribuem para a estabilidade dos ecossistemas, participando de vários ciclos biogeoquímicos. No ecossistema aquático, esses organismos participam da decomposição de matéria orgânica em nutrientes e do controle da qualidade da água (Newton et al., 2011; Bronmark; Lansson, 2005). Nas últimas décadas, esse ambiente tem sido alterado de maneira significativa em função do crescente processo de urbanização, modificando a estrutura e a diversidade dos microrganismos ali presente (Freitas et al., 2011; Purificação-Junior et al., 2016).

A identificação e caracterização desses microrganismos são necessárias para entender o impacto ambiental e sua influência na composição e dinâmica da microbiota local (Hemme et al., 2015; Trexler et al., 2014), além de identificar bactérias patogênicas de importância para saúde pública (Martin et al., 2017).

Tradicionalmente, as técnicas de identificação bacteriana são baseadas nas características morfológicas e fenotípicas e são utilizadas como primeira diferenciação entre as amostras. Contudo, essas técnicas convencionais são, muitas vezes, limitadas por sua baixa capacidade de diferenciação de espécies e pelo custo, além de consumirem tempo e serem laboriosas (Woo et al., 2008; Santos et al. 2016).

Com o surgimento da Biologia Molecular, diversas técnicas foram desenvolvidas, contribuindo significativamente para um grande avanço do conhecimento da diversidade microbiana. Dentre essas técnicas, a análise comparativa de sequências nucleotídicas do gene *16S rRNA* tem sido considerada como “padrão ouro” em estudos taxonômicos e filogenéticos (Srinivasan et al., 2015).

Recentemente novas tecnologias têm sido desenvolvidas, como a Matrix-assisted Laser Desorption/ionization-time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), que vem sendo utilizada como uma técnica simples, confiável e rápida (De Bruyne et al., 2011; Martin et al.,

2017; Starostin et al., 2017). Esta técnica é baseada na análise de um *fingerprint* de proteínas ribossomais e outras proteínas básicas que são específicas para cada espécie microbiana (Wilkins et al., 2006; Giebel et al., 2010). Dentre suas diversas vantagens, destacam-se: utilização de células intactas de microrganismos que podem ser obtidas diretamente do meio de cultivo, custo-benefício (US\$2/amostra), curto tempo de processamento e análise, e alto rendimento (o consumo de material biológico é insignificante) (Allen et al., 2015; Avanzi et al., 2017).

Vários estudos têm demonstrado a eficiência e a alta reprodutibilidade desse método, entretanto, a maioria é direcionado para microrganismos de interesse clínico, como *Escherichia coli* e outros membros da família *Enterobacteriaceae* (Yu et al., 2018), *Staphylococcus aureus* (Zhang et al., 2015) e *Streptococcus pneumoniae* (Nakano et al., 2015), com número reduzido de estudos voltados para identificação de bactérias de origem ambiental (Viver et al., 2015; Martin, et al., 2017; Timperio et al., 2017).

O riacho Cavouco corresponde a um riacho urbano impactado o qual recebe um aporte de carga poluidora de resíduos provenientes de laboratórios de ensino e pesquisa, resíduo hospitalar, além de despejo doméstico oriundos da população circunvizinha. O efeito cumulativo desses resíduos vem provocando mudanças na dinâmica desse ecossistema, alterando de forma expressiva a qualidade da água e contribuindo para a ocorrência e disseminação de bactérias patogênicas (Araújo; Oliveira, 2013; Freitas et al., 2016; Purificação-Junior et al., 2016).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a aplicabilidade de diferentes técnicas para analisar e monitorar um ambiente aquático impactado por meio da identificação da sua população microbiana.

2. Materiais e Métodos

2.1 Isolamento e caracterização morfológica

Foram realizadas coletas de água (superfície e a 30 cm de profundidade) em cinco pontos estratégicos do riacho Cavouco de acordo com Purificação-Junior et al. (2016). Para o isolamento bacteriano, foi retirado 50 µl da água coletada e com auxílio de uma alça Drigalski foram semeadas em ágar eosina azul de metileno (EMB) e ágar nutriente (AN). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 e 48 horas e após esse período foi realizada a análise morfológica das colônias isoladas, avaliando as seguintes características: forma, borda, superfície, transparência, coloração, presença de muco e brilho. Os isolados foram identificados com a denominação de P (ponto) com número do local da coleta, S (superfície) ou P (profundidade), seguido de letra referente as colônias isoladas de cada placa.

2.2 Identificação por MALDI-TOF-MS

Após 24h de crescimento em meio Brain Heart Infusion (BHI), colônias bacterianas foram ressuspensas em água deionizada e em seguida realizada a inativação das células e a extração de proteínas pelo método descrito por Starostin et. al. (2015), com algumas modificações. Para análise dos espectros de massa, 1µl de extrato de proteína foi colocado em placa (96 MSP, Bruker Daltonics, EUA), seguida de secagem ao ambiente. 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 sobre as amostras 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).

Cada isolado foi analisado em triplicata, em dois experimentos independentes. Os espectros obtidos foram comparados com o Banco de Dados MALDI Biotyper Version 3.1 e o resultado expresso em valores de similaridades como um “log score”, seguindo os critérios:

scores maiores que 2.000 indicaram alta probabilidade de identificação de espécie; scores maiores que 1.700 identificação em nível de gênero; scores menores que 1.700 identificação não confiável (Ng et al., 2012; Schulthess et al., 2013).

2.3 Extração de DNA genômico

A extração do DNA cromossômico foi realizada por meio da técnica descrita por Sambrook et al. (2001), com algumas modificações. A qualidade e a concentração do DNA extraído foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE 0,5x, a 100V por 1h, utilizando o marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Em seguida, o gel foi analisado em transiluminador ultravioleta e fotodocumentado.

2.4 Amplificação e Sequenciamento do gene 16S rRNA por PCR

O gene *16S rRNA* foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991). A amplificação das amostras foi efetuada em volume final de 25 uL contendo tampão 10X, dNTPs (10mM.), MgCl₂ (50mM.) e Taq polimerase (2,5 U/μl) (Invitrogen), iniciadores (15 pmol/ μl) e DNA (20 ng/ μl). As reações foram realizadas em termociclador (C1000 Thermal Cycler – BioRad), programado com um ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos, cada ciclo consistindo de uma etapa de desnaturação (95°C por 45 segundos), uma etapa de anelamento (60,0°C por 45 segundos) e uma etapa de extensão (72°C por 2 minutos) e, por fim, uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram purificados seguindo o protocolo do kit de purificação PureLink (Invitrogen) e em seguida sequenciados em sequenciador automático de DNA ABI 3100. As sequências obtidas foram comparadas com linhagens padrão de coleções internacionais depositadas no banco de dados Genbank do NCBI usando a ferramenta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e alinhadas multiplamente com os software

Mega 5.2. O programa ClustalW foi utilizado para a construção de um dendograma pelo método neighbor-joining.

3. Resultados

Foi observado crescimento de colônias bacterianas nos cinco pontos (superfície e profundidade), sendo obtido um total de 50 isolados. As características morfológicas, em geral, apresentaram pequena variação para a forma das colônias (Tabela 1), porém diversidade para os demais parâmetros investigados. Dentre os isolados, 92% (n=46) apresentaram forma circular, 6% (n=3) filamentosa e apenas o isolado P5PAb forma rizoide. Quanto à borda da colônia, foi verificado que 54% (n=27) apresentaram borda inteira, 18% (n=9) lobulada, enquanto que para borda ondulada e filamentosa foram 16% e 12%, respectivamente. Para a superfície da colônia, 74% (n=37) dos isolados apresentaram superfície lisa e os demais, superfície rugosa. Quanto à transparência da colônia, 86% (n=43) apresentaram-se opacas e 14% (n=7) transparentes. Para a cor da colônia, em 84% (n=42) foi observada a coloração creme e 16% (n=8) amarelada. Quanto à produção de muco, verificou-se que 84% (n=42) foram capazes de produzir muco e os demais não, sendo considerados secos. Dentre os isolados, 56% (n=28) apresentaram colônias brilhosas (Tabela 1). Apesar da importância desse método para o isolamento e purificação dos isolados o mesmo não foi eficiente para identificá-los ao nível taxonômico.

Na técnica MALDI-TOF-MS todos os isolados foram identificados com valores de score entre 1.718 e 2.415, exceto o isolado P3PAh que apresentou um score menor (1.518). Dentre esses isolados, 86% (n=43) apresentaram valores maior que 2.000, sendo identificados ao nível de espécie com alta confiabilidade, e 12% (n=7) com valores maiores que 1.700, possibilitando a identificação confiável de gênero (Tabela 2).

A partir dos resultados obtidos, foram identificados 13 gêneros bacterianos divididos entre quatro gram-positivos (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brachybacterium*, *Exiguobacterium*) e nove gram-negativos (*Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Brevundiomonas*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Providencia*), nos diferentes pontos investigados. Entre os gram-positivos, o gênero *Bacillus* esteve presente em todos os pontos e foi o mais prevalente, com 18 isolados representados pelas espécies *B. cereus* (n=14), *B. pumulis* (n=2) e *B. altitudinis* (n=1). Outro gênero predominante foi *Staphylococcus* com cinco isolados pertencentes às espécies *S. saprophyticus* (n=2) e *S. sciuri* (n=3). Outras espécies gram-positivas identificadas foram *Brachybacterium faecium* (n=1) e *Exigubacterium sp.* (n=1), nos pontos 2 e 3, respectivamente.

Membros da família Enterobacteriaceae foram obtidos em todos os pontos, exceto no ponto 1. Entre as gram-negativas, destaca-se a presença do gênero *Enterobacter* representado pelas espécies *E. cloacae* (n=2; pontos 2 e 4), *E. kobei* (n=2; pontos 2 e 3) e *E. asburiae* (n=1; ponto 3). Além dessas, outras espécies apresentaram alta prevalência como os isolados *Escherichia coli* (n=5; pontos 2, 3, 4 e 5), *Klebsiella pneumoniae* (n=4; pontos 2, 3 e 4), *Acinetobacter radioresistens* (n=3, pontos 2 e 3) e *Proteus mirabilis* (n=3; pontos 4 e 5). Com menor frequência foram identificados isolados pertencentes às espécies *Brevundiomonas diminuta* (n=2; pontos 3 e 5), *Providencia rettgeri* (n=2; ponto 4), *Alcaligenes faecalis* (n=1; ponto 4) e *Pseudomonas putida* (n=1; ponto 3). A partir dessas análises, verificou-se que o ponto 2 apresentou maior diversidade microbiana, com nove espécies diferentes enquanto no ponto 1 foi observado a menor diversidade, representado com apenas três espécies (Figura 1).

As sequências do gene *16S rRNA* (aproximadamente 1.500 pb) foram alinhadas e comparadas com sequências previamente depositadas no banco de dados GenBank, e apresentaram valores de similaridade entre 97-99%, revelando alto grau de similaridade genética e possibilitando a confirmação da identidade de todos os isolados obtida pela técnica

MALDI-TOF-MS (Tabela 2). O isolado P3PAh, não identificado pelo MALDI-TOF-MS, apresentou 99% de similaridade com a sequência da espécie *Exiguobacterium sp.* A partir do dendograma, observou-se o agrupamento entre as sequências obtidas nesse estudo com as do banco de dados, confirmando a identificação molecular (Figura 2).

4. Discussão

A diversidade microbiana nos ecossistemas aquáticos é determinada por várias características ambientais como temperatura, salinidade, pH, entre outras (Zhang; Zhang, 2009). Nas últimas décadas, o processo de urbanização e seus impactos ambientais têm interferido na dinâmica desses ecossistemas, modificando a estrutura e função das comunidades microbianas (Freitas et al, 2011). A rápida identificação de microrganismos presentes em ambientes aquáticos impactados é necessária para o monitoramento de mudanças na comunidade bacteriana e para identificar possíveis riscos à saúde pública. Diante desse fato, o presente estudo se propôs a avaliar a aplicabilidade de técnicas que possibilitem uma rápida e confiável identificação de microrganismos provenientes de um riacho urbano impactado.

A partir da caracterização morfológica dos 50 isolados, obtidos dos diferentes pontos do riacho Cavouco, verificou-se uma pequena variação entre as características morfológicas analisadas, apresentando baixo poder discriminatório. Tradicionalmente, os métodos fenotípicos incluindo análises morfológicas e fisiológicas, vem sendo amplamente utilizados como primeira diferenciação dos isolados. Contudo, esses métodos apresentam uma baixa reprodutibilidade e nem sempre permitem uma identificação precisa ao nível de espécie (Elmaci et al., 2015; Markiewicz et al., 2010) e por isso outros métodos complementares são recomendados para uma confiável identificação.

Recentemente, o MALDI-TOF-MS tem sido amplamente utilizado na investigação e identificação de proteínas e peptídeos que permitem a identificação de espécies microbianas.

Vários estudos têm demonstrado a alta reprodutibilidade deste método quando comparado com outros considerados “padrão-ouro” (Bruyne et al., 2011; Lo et al., 2015; Sharma et al., 2017). Sua efetiva aplicação requer a utilização de bancos de dados comerciais, além de softwares específicos para comparação dos espectros proteicos. Várias plataformas comerciais foram desenvolvidas para essas análises, entretanto, são direcionadas para microrganismos de interesse clínico (Carbonnelle et al., 2011). Diante desse fato, para microbiologia ambiental, essa técnica ainda é pouco explorada, sendo mais utilizada para investigar espécie única ou grupos microbianos selecionados. Estudos sobre comunidades microbianas ambientais são limitados e, geralmente, necessitam da validação de outros métodos de identificação (Koubek et al., 2012; Viver et al., 2015; Avanzi et al., 2017).

No presente trabalho, os isolados foram identificados por meio da técnica de MALDI-TOF-MS, no qual 86% foram identificados ao nível de espécie e 12% de gêneros com alta confiabilidade, dentre eles, os isolados pertencentes a *Enterobacter*, *Bacillus* e *Providencia*. Os espectros bacterianos obtidos podem ser influenciados pelas mudanças ambientais, alterando processos celulares, consequentemente, modificando o perfil protéico e dificultando a identificação das espécies dos microrganismos (Lay, 2001; Martin et al., 2017). No estudo realizado por Avazi et al. (2016) os autores identificaram bactérias isoladas de uma mina de cobre por meio do MALDI-TOF-MS e relataram a dificuldade de identificar os gêneros *Bacillus* e *Enterobacter*. Segundo eles, apesar desses isolados serem representados no banco de dados, há uma ampla diversidade genética desses gêneros dificultando sua identificação.

Dentre os isolados estudados, apenas P3PAh não teve sua identidade confirmada por essa técnica, sendo posteriormente identificado como pertencente à espécie *Exiguobacterium* sp. por meio do sequenciamento do gene *16S rRNA*. Esse dado corrobora com o resultado obtido por Timperio et al. (2017), no qual um isolado pertencente a espécie *Exiguobacterium oxidotolerans* não foi identificado devido a ausência de um espectro de referência no banco de

dados. Curiosamente, Purificação-Junior et al. (2016) apresentou dificuldade na identificação desse gênero no mesmo ambiente, sendo fenotipicamente identificado como pertencente a espécie *Staphylococcus hominis*. Essa divergência foi justificada pelo fato de que ambos os gêneros apresentam características morfológicas e bioquímicas bastante semelhantes.

O sequenciamento do gene *16S rRNA* foi utilizado para confirmar a acurácia dos resultados obtidos pelo MALDI-TOF-MS. O gene *16S rRNA* é amplamente utilizado como marcador filogenético, pois apresenta sequências altamente conservadas entre regiões variáveis, está presente e desempenha a mesma função em todos os organismos, não é afetado por mudanças ambientais e apresenta um tamanho suficiente para ser utilizado em inferências taxonômicas (Srinivasan et al., 2015). As sequências desse gene já foram determinadas para um número grande de linhagens bacterianas e estão, em sua maioria, depositadas no GenBank (Clarridge, 2004; Benson et al., 2012), e por isso, esta técnica é considerada padrão ouro para identificação microbiana.

De acordo com Stackebrandt e Goebel (1994), para considerar que isolados pertencem a mesma espécie é necessário que ela possua uma homologia na sequência do gene *16S rRNA* maior que 97%. As sequências obtidas no presente estudo apresentaram valores de similaridade entre 97-99%, permitindo a confirmação da identidade dos isolados.

Foi observada uma concordância de 100% entre os dois métodos moleculares testados, demonstrando a confiabilidade do MALDI-TOF-MS para a identificação de microrganismos de um ambiente impactado. Alguns trabalhos vêm comparando a aplicabilidade desses dois métodos para este fim, obtendo concordância entre 50-100%, dependendo dos gêneros estudados (Avanzi et al. 2017; Emami et al., 2016; Santos et al., 2017). Timperio et al. (2017) avaliaram os dois métodos para identificar bactérias isoladas do oceano Ártico e obtiveram concordância de 100% a nível de gênero. Resultado semelhante foi obtido por Avanzi et al.

(2017) ao investigar a eficiência do MALDI-TOF-MS na identificação de bactérias resistentes ao cobre isoladas de mineração ambiental.

Em controvérsia, Oberbeckman et al. (2011), obteve apenas 43% de concordância ao analisar isolados de *Vibrio* obtidos de águas temperadas. Essa diferença nas taxas de concordância ocorre, principalmente, devido à limitação do banco de dados (Kopcakova et al., 2014), revelando a necessidade de mais estudos na área de microbiologia ambiental, com o objetivo de adicionar novos espectros proteicos no banco de dados para consultas futuras.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível ampliar a caracterização da microbiota do ecossistema investigado inicialmente ocorrida por Purificação-Junior et al., (2016). No presente trabalho, o gênero *Bacillus* foi o mais prevalente, sendo encontrado em todos os pontos. Esse gênero é ubíquo na natureza, podendo ser encontrado na água, solo, sedimentos e plantas (Ceuppens, et al, 2013; Brillard et al, 2014; Larrea-Murrel, 2018). Em condições de estresse ambiental, como contaminação, essa bactéria pode produzir endósporos e se manter dormente por um longo período de tempo (Gosh; Setlow, 2009). Das espécies identificadas, *Bacillus cereus* é conhecida por ser um patógeno humano, podendo ser responsável por várias infecções (Han et al., 2006; Stenfors Arnesen et al, 2008). Além de *Bacillus cereus*, outras espécies isoladas do ambiente estudado, são descritas na literatura como potenciais patógenos humanos *Staphylococcus saprophyticus* (Paiva-Santos et al., 2018), *Brevundiomonas diminuta* (Ryan; Pembroke, 2018), *Acinetobacter radioresistens* (Visca et al., 2001).

Membros da família Enterobacteriaceae foram obtidos na maioria dos pontos do riacho Cavouco, representados por espécies como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* e *Providencia rettgeri*. A maioria dessas espécies é comumente encontrada no trato intestinal de seres humanos e animais, e sua presença em ambientes aquáticos indica a contaminação de origem fecal (Liu et al., 2015; Pall et al., 2015).

Purificação-Junior et al. (2016) realizaram a análise da qualidade da água e caracterizaram a microbiota amostral do riacho Cavouco, observando a presença de coliformes totais e termotolerantes e identificando espécies de enterobactérias semelhantes ao encontrado no presente estudo. Este fato confirma a importância do monitoramento desse ambiente e a necessidade de uma técnica de identificação microbiana rápida e confiável, a fim de avaliar o nível de contaminação e os possíveis riscos à saúde pública.

5. Conclusão

O presente estudo revelou que o MALDI-TOF-MS foi eficiente para identificação de microrganismos isolados de um ambiente impactado. Apesar da limitação dos bancos de dados, essa técnica apresentou alta taxa de identificação e corroborou com os resultados obtidos pelo sequenciamento do gene *16S rRNA*. Esses resultados sugerem que o MALDI-TOF-MS é uma técnica rápida, confiável e de baixo-custo para caracterizar comunidades microbianas em ambientes aquáticos impactados. Contudo, para uma identificação mais acurada de espécies, os bancos de dados necessitam ser expandidos com espectros proteicos de um maior número de isolados ambientais. A partir dos resultados obtidos, verificou-se a presença de microrganismos patogênicos no riacho Cavouco, configurando esse ambiente como um risco potencial de transmissão de doenças de veiculação hídrica e evidenciando a importância de um constante e eficaz monitoramento da microbiota local.

6. Referências

Avanzi, I.R.; Gracioso, L.H.; Baltazar, M.D.; Karolski, B.; Perpetuo, E.A.; do Nascimento, C.A. Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. **Environ Sci Pollut Res Int.** 24(4):3717-3726, 2017.

Benson, D. A.; Karsch-Mizrachii; Clark, K.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; Sayers, E. W. Genbank. **Nucleic Acids Research**. 40: 48-53, 2012.

Brillard, J.; Dupont, C.M.; Berge O.; Dargaignaratz, C.; Oriol-Gagnier, S.; Doussan, C.; Broussolle, V.; Gillon, M.; Clavel, T.; Bérard, A. The Water Cycle, a Potential Source of the Bacterial Pathogen *Bacillus cereus*. **Biomed Res Int**. 2015:356928, 2015.

Brönmark, C.; Hansson, L.A. The Biology of Lakes and Ponds Oxford: Oxford University Press, India, 2005.

Carbonnelle, E.; Grohs, P.; Jacquier, H.; Day, N.; Tenza, S; Dewailly, A.; Vissouarn, O.; Rottman, M.; Herrmann, J.L; Podglajen, I.; Raskine, L. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. **J Microbiol Methods**. 89(2), 2012.

Ceuppens, S.; Boon, N.; Uyttendaele, M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. **FEMS Microbiol Ecol**. 84(3):433-50, 2013.

Clarridge III, J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**. 17 (4):840-862, 2004.

De Bruyne, K.; Slabbinck, B.; Waegeman, W.; Vauterin, P.; De Baets, B.; Vandamme, P. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. **Syst Appl Microbiol**. 34(1):20-9, 2011.

Elmaci, S.B.; Tokath, M.; Dursun, D.; Özçelik, F.; Sanlibaba, P. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. **Folia Microbiol**. 60:241-251, 2015.

Emami, K.; Nelson, A; Hack, E.; Zhang, J.; Green, D.H.; Caldwell, G.S.; Mesbahi, E. MALDI-TOF Mass Spectrometry Discriminates Known Species and Marine Environmental Isolates of *Pseudoalteromonas*. **Front Microbiol**. 12:7:104, 2016.

Freitas, M.B.; Brilhante, O.M.; Almeida, L.B. The importance of water testing for public health in two regions in Rio de Janeiro: a focus on fecal coliforms, itrates, and aluminum. **Cad Saúde Pública**. 17:651-660, 2011.

Ghosh, S.; Setlow, P. Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species. **J. Bacteriol.** 191 (6):1787–1797, 2009.

Han, C.S.; Xie, G.; Challacombe, J.F.; Altherr, M.R.; Bhotika, S.S.; Bruce, D.; Campbell, C.S.; Campbell, M.L.; Chen, J.; Chertkov, O. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. **J. Bacteriol.** 188 (9):3382–3390, 2006.

Hemme, C.L.; Tu, Q.; Quin, Y.; Gao, W.; Deng, Y.; Nostrand, J.D.V.; Wu, L.; He, Z.; Chain, P.S.; Tringe, S.G. Comparative metagenomics reveals impact of contaminants on groundwater microbiomes. **Front. Microbiol.** 6:1205, 2015.

Larrea-Murrell, J.A.; Rojas-Badia, M.M, García-Soto, I; Romeu-Alvarez, B.; Bacchetti, T.; Gillis, A; Boltes-Espinola, A.K.; Heydrich-Perez, M; Lugo-Moya, D.; Mahillon, J. Diversity and enzymatic potentialities of *Bacillus* sp. strains isolated from a polluted freshwater ecosystem in Cuba. **World J Microbiol Biotechnol.** 19;34(2):28, 2018.

Liu, W.C.; Chan, W.T; Young, C.C. Modeling fecal coliform contamination in a tidal Danshuei River estuarine system. **Sci Total Environ** 502:632-40, 2015.

Lo, C.I; Fall, B.; Sambe-Ba, B.; Diawara, S.; Gueye, M.W.; Mediannikov, O.; Sokhna, C.; Faye, N.; Diemé, Y.; Wade, B.; Raoult, D.; Fenollar, F. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Clinical Microbiology at Hôpital Principal de Dakar, Senegal (West Africa). **PLoS One.** 30;10(12), 2015.

Martin, M.S.; Santos, I.C.; Carlton, D.D. Jr, .; Granados, P.; Hildenbrand, Z.L.; Schug, K.A. Characterization of bacterial diversity in contaminated groundwater using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Sci Total Environ.** 1;622-623:1562-1571, 2018.

Michael P. Ryan; J. Tony Pembroke. *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens, **Virulence.** 9:1, 480-493 2, 2018.

Nakano, S.; Matsumura, Y.; Ito, Y.; Fujisawa, T.; Chang, B.; Suga, S.; Kato, K.; Yunoki, T.; Hotta, G.; Noguchi, T.; Yamamoto, M.; Nagao, M.; Takakura, S.; Ohnishi, M.; Ihara T, Ichiyama S. Development and evaluation of MALDI-TOF MS-based serotyping for *Streptococcus pneumoniae*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 34(11):2191-8, 2015.

Newton, R.J.; Jones, S.E.; Eiler, A.; McMahon, K.D.; Bertilsson, S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. **Microbiol Mol Biol Ver.** 75:14-49, 2011.

Ng, L.S.; Sim, J.H.; Eng, L.C.; Menon, S.; Tan, T.Y. Comparison of phenotypic methods and matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry for the identification of aero-tolerant *Actinomyces* spp. isolated from soft-tissue infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 31(8):1749-52, 2012.

Oberbeckmann, S.; Wichels, A.; Maier, T.; Kostrzewa, M.; Raffelberg, S.; Gerdt, G. A polyphasic approach for the differentiation of environmental *Vibrio* isolates from temperate waters. **FEMS Microbiol Ecol.** 75(1):145-62, 2011.

Paiva-Santos, W.; de Sousa, V.S.; Giambiagi-deMarval, M. Occurrence of virulence-associated genes among *Staphylococcus saprophyticus* isolated from different sources. **Microbial Pathogenesis.** 119:9-11, 2018.

Páll, E.; Niculae, M.; Kiss, T.; Şandru, C.D.; Spînu, M. Human impact on the microbiological water quality of the rivers. **J Med Microbiol.** 62:1635-1640, 2013.

Rand, G.M.; Wells, P.G.; Mccarty, L.S. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. 2 ed. Washington: Taylor & Francis, p. 947, 1995.

Sambrook, J.; Russell, D.W. Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 3rd ed, 2001.

Santos, I.C.; Hildenbrand, Z.L.; Schug, K.A. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. **Analyst.** 141:2827-2837, 2016.

Santos, I.C.; Martin, M.S.; Carlton, D.D.; Amorim, C.L.; Castro, P.M.L.; Hildenbrand, Z.L.; Schug, K.A. MALDI-TOF MS for the Identification of Cultivable Organic-Degrading Bacteria in Contaminated Groundwater near Unconventional Natural Gas Extraction Sites. **Microorganisms.** 10;5(3), 2017.

Schulthess, B.; Brodner, K.; Bloemberg, G.V.; Zbinden, R.; Böttger, E.C.; Hombach, M. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and

implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. **J Clin Microbiol.** 51(6):1834-40, 2013.

Sharma, M.; Gautam, V.; Mahajan, M.; Rana, S.; Majumdar, M.; Ray, P. Direct identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) from positive blood culture bottles: An opportunity to customize growth conditions for fastidious organisms causing bloodstream infections. **Indian J Med Res.** 146(4):541-544, 2017.

Srinivasan, R.; Kraoz, U.; Volegova, M.; Mackichan, J.; Kato-maeda, M.; Miller, S.; et al. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. **PLoS ONE.** 10(2), 2015.

Stackebrandt, E.; Goebel, B.E. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Int J Syst Bacteriol.** 44:846–849, 1994.

Starostin, K.V.; Demidov, E.A.; Bryanskaya, A.V.; Efimov, V.M.; Rozanov, A.S.; Peltek, S.E. Identification of Bacillus strains by MALDI TOF MS using geometric approach. **Sci Rep.** 23(5):16989, 2015.

Timperio, A.M.; Gorrasi, S.; Zolla, L.; Fenice, M. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. **PLoS One.** 24;12(7), 2017.

Trexler, R.; Solomon, C.; Brislawn, C.J.; Wright, J.R.; Rosenberger, A.; McClure, E.E.; Grube, A.M.; Peterson, M.P.; Keddache, M.; Mason, O.U. Assessing impacts of unconventional natural gas extraction on microbial communities in headwater stream ecosystems in Northwestern Pennsylvania. **Front. Microbiol.** 5:522, 2014.

Visca, P.; Petrucca, A.; De Mori, P.; Festa A.; Boumis, E.; Antinori, A.; Petrosillo N. Community-acquired Acinetobacter baumannii bacteremia in an HIV-positive patient. **Emerg Infect Dis.** 7(6):1032-5, 2001.

Viver, T.; Cifuentes, A.; Díaz, S.; Rodríguez-Valdecantos, G.; González, B.; Antón, J.; Rosselló-Móra, R. Diversity of extremely halophilic cultivable prokaryotes in Mediterranean,

Atlantic and Pacific solar salterns: Evidence that unexplored sites constitute sources of cultivable novelty. **Syst Appl Microbiol.** 38(4):266-75, 2015.

Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.** 173:697-703, 1991.

Woo, P.C.Y.; Lau, S.K.P.; Teng, J.L.L.; Tse, H.; Yuen, K-Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 14:908-934, 2008.

Yu, J.; Liu, J.; Li, Y.; Yu, J.; Zhu, W.; Liu, Y.; Shen, L. Rapid detection of carbapenemase activity of Enterobacteriaceae isolated from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** 18,17(1):22, 2018.

Zhang T, Ding J, Rao X, Yu J, Chu M, Ren W, Wang L, Xue W. Analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* major clonal lineages by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). **J Microbiol Methods.** 117:122-7, 2015.

Zhang, X.-X.; Zhang, T.; Fang, H.H.P. Antibiotic resistance genes in water environment. **Appl Microbiol Biotechnol.** 82(3):397–414, 2009.

FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Características morfológicas de isolados bacterianos obtidos de um riacho urbano impactado em Pernambuco, Brasil.

Pontos	Isolados	Forma	Borda	Superfície	Transparência	Coloração	Muco	Brilho
P1	P1PAa	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	-
	P1PAc	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Amarela	-	-
	P1PAd	Circular	Lobulada	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P1PAe	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Amarela	-	-
	P1PAh	Circular	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme	+	+
	P1SBf	Circular	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme	-	-
P2	P1SBg	Circular	Lobulada	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P2PBa	Circular	Lobulada	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P2PBb	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	+	+
	P2PBc	Circular	Lobulada	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P2SAb	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	+
	P2SAc	Circular	Inteira	Lisa	Transparente	Creme	-	+
	P2SAd	Circular	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme	+	+
	P2SBa	Circular	Filamentosa	Lisa	Opaca	Amarela	-	+
	P2SBc	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	+
	P2Sbd	Circular	Inteira	Lisa	Transparente	Creme	+	+
	P2SBe	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Amarela	-	-
	P2SBf	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Amarela	+	+
	P2SBg	Circular	Lobulada	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P3PAc	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	+
P3	P3PAd	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	+
	P3PAe	Circular	Inteira	Lisa	Transparente	Creme	-	+
	P3PAf	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	-
	P3PAg	Circular	Lobulada	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P3SAa	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	-
	P3SAb	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	-
	P3SAc	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	-
	P3SAd	Filamentosa	Filamentosa	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P3SAe	Circular	Inteira	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P3SAf	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	-
	P3SAg	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Amarela	-	-
	P3SAi	Circular	Filamentosa	Lisa	Opaca	Creme	-	-
	P4PAb	Rizoide	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme	-	+
	P4PAc	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	+
P4	P4PAd	Circular	Ondulada	Lisa	Transparente	Creme	+	+
	P4SAa	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Amarela	-	+
	P4SAb	Filamentosa	Filamentosa	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P4SAc	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	-
	P4SAd	Filamentosa	Filamentos	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P4SAe	Circular	Lobulada	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P4SAf	Circular	Lobulada	Rugosa	Opaca	Creme	-	-
	P4SAg	Circular	Inteira	Lisa	Transparente	Creme	-	+
	P5PAa	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	+
	P5PAb	Rizoide	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme	-	-
P5	P5PAc	Circular	Ondulada	Lisa	Transparente	Creme	+	+
	P5PAd	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	-	+
	P5PAe	Circular	Ondulada	Lisa	Transparente	Creme	+	+
	P5PAf	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Amarela	-	-
	P5SAa	Circular	Inteira	Lisa	Opaca	Amarela	-	+
	P5SAg	Circular	Filamentosa	Lisa	Opaca	Creme	-	-
	P5SAg _I	Circular	Lobular	Rugosa	Opaca	Creme	-	-

Tabela 2: Caracterização molecular (MALDI-TOF-MS e sequenciamento do gene *16S rRNA*) de isolados bacterianos obtidos de um riacho urbano impactado em Pernambuco, Brasil.

Points	Isolates	MALDI-TOF-MS		<i>16S rRNA</i> gene sequencing		
		Species	Score	Species	Similarity	Accession
P1	P1SBf	<i>Bacillus cereus</i>	2.281	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P1SBg	<i>Bacillus cereus</i>	2.144	<i>Bacillus cereus</i>	98%	HBU07116
	P1PAa	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2.277	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99%	KM37850
	P1PAd	<i>Bacillus cereus</i>	2.134	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P1PAh	<i>Bacillus pumulis</i>	2.019	<i>Bacillus pumulis</i>	99%	MF662817
P2	P2SAb	<i>Enterobacter cloacae</i>	1.818	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	HBU07116
	P2SAc	<i>Escherichia coli</i>	2.231	<i>Escherichia coli</i>	99%	MH532537
	P2SAd	<i>Bacillus pumulis</i>	2.028	<i>Bacillus pumulis</i>	99%	MF662817
	P2SBa	<i>Brachybacterium faecium</i>	2.036	<i>Brachybacterium faecium</i>	99%	NR_119205
	P2SBc	<i>Staphylococcus sciuri</i>	2.008	<i>Staphylococcus sciuri</i>	99%	MG517422
	P2SBD	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2.002	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99%	KM37850
	P2SBe	<i>Bacillus cereus</i>	2.150	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P2SBf	<i>Enterobacter kobei</i>	2.279	<i>Enterobacter kobei</i>	99%	MF953259
	P2SBg	<i>Bacillus cereus</i>	2.115	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P2PBa	<i>Bacillus cereus</i>	1.997	<i>Bacillus cereus</i>	98%	HBU07116
	P2PBb	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.415	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	KU254764
	P2PBc	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2.311	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	98%	KF963620
	P3SAa	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2.369	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	97%	KF963620
	P3SAb	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2.213	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	98%	KF963620
	P3SAc	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.365	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	JX435602
P3	P3SAd	<i>Bacillus cereus</i>	2.180	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P3SAe	<i>Escherichia coli</i>	2.340	<i>Escherichia coli</i>	99%	MH532537
	P3SAf	<i>Pseudomonas sp.</i>	2.063	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	JQ994361
	P3SAg	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.096	<i>Enterobacter asburiae</i>	99%	JQ579638
	P3SAi	<i>Bacillus cereus</i>	2.196	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P3PAc	<i>Escherichia coli</i>	2.267	<i>Escherichia coli</i>	99%	MH532537
	P3PAd	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.159	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	LC141104

P4	P3PAe	<i>Enterobacter kobei</i>	2.381	<i>Enterobacter kobei</i>	99%	MF953259
	P3PAf	<i>Brevundiomonas diminuta</i>	2.236	<i>Brevundiomonas diminuta</i>	98%	MH211324
	P3PAg	<i>Bacillus cereus</i>	2.227	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P3PAh	--	-	<i>Exiquobacterium sp.</i>	99%	MG757525
	P4SAa	<i>Alcaligenes faecalis</i>	2.185	<i>Alcaligenes faecalis</i>	99%	KY357285
	P4Sab	<i>Bacillus pumulis</i>	1.880	<i>Bacillus pumulis</i>	99%	MF662817
	P4SAc	<i>Enterobacter clocae</i>	1.718	<i>Enterobacter clocae</i>	99%	KX036856
	P4Sad	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.114	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	FJ828890
	P4SAe	<i>Bacillus sp.</i>	1.970	<i>Bacillus sp.</i>	99%	AB841264
	P4SAf	<i>Bacillus cereus</i>	2.201	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P4SAg	<i>Escherichia coli</i>	2.328	<i>Escherichia coli</i>	99%	MH532537
	P4PAb _I	<i>Providencia rettgeri</i>	1.928	<i>Providencia rettgeri</i>	99%	KX289656
	P4PAb _{II}	<i>Bacillus cereus</i>	2.329	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P4PAc	<i>Providencia rettgeri</i>	2.381	<i>Providencia rettgeri</i>	99%	KX289656
	P4PAd	<i>Proteus mirabilis</i>	2.167	<i>Proteus mirabilis</i>	99%	MH532480
P5	P5SAe	<i>Proteus mirabilis</i>	2.003	<i>Proteus mirabilis</i>	99%	MH532480
	P5SAg	<i>Bacillus cereus</i>	2.135	<i>Bacillus cereus</i>	98%	HBU07116
	P5SAg _I	<i>Bacillus cereus</i>	2.051	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P5SAG _{II}	<i>Brevundiomonas diminuta</i>	2.389	<i>Brevundiomonas diminuta</i>	98%	MH211324
	P5PAa	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1.967	<i>Staphylococcus sciuri</i>	99%	MG517422
	P5PAb	<i>Bacillus cereus</i>	2.165	<i>Bacillus cereus</i>	99%	HBU07116
	P5PAc	<i>Proteus mirabilis</i>	2.171	<i>Proteus mirabilis</i>	99%	KX275402
	P5PAe	<i>Escherichia coli</i>	2.173	<i>Escherichia coli</i>	99%	MH532537
	P5PAf	<i>Staphylococcus sciuri</i>	2.185	<i>Staphylococcus sciuri</i>	98%	MG517422

Figura 1: Análise comparativa de métodos moleculares (MALDI-TOF-MS e sequenciamento do gene *16S rRNA*) na identificação e distribuição de isolados bacterianos em um ambiente aquático impactado.

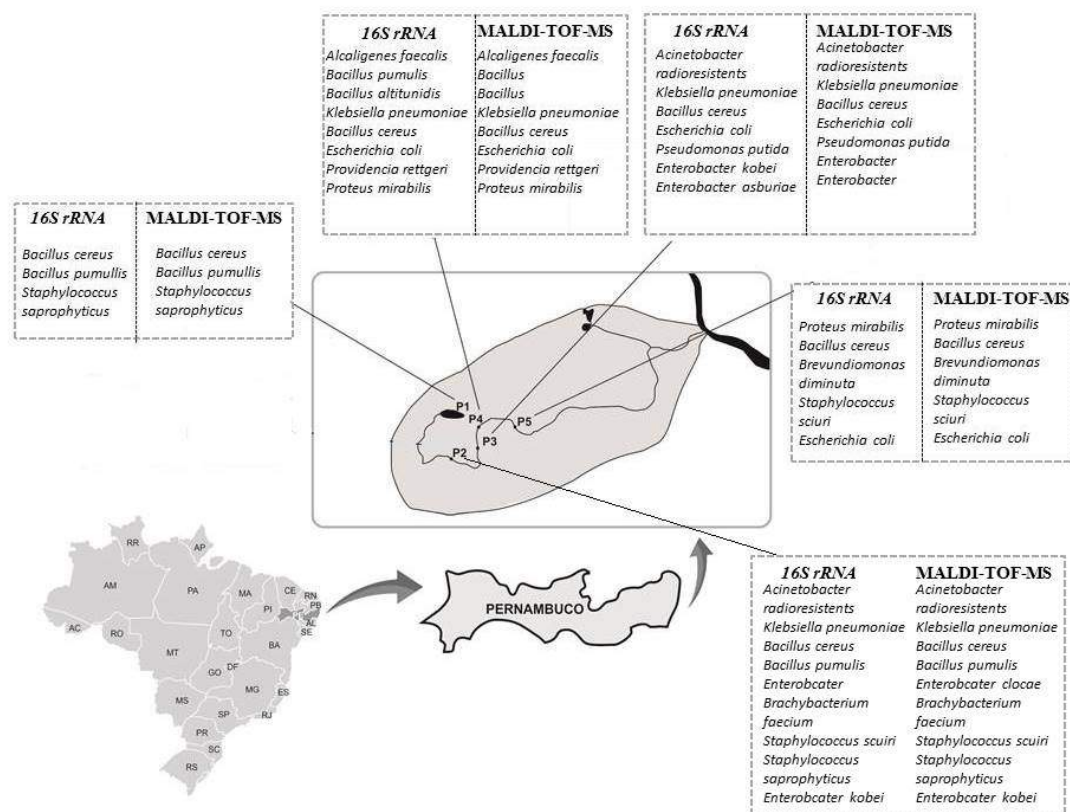
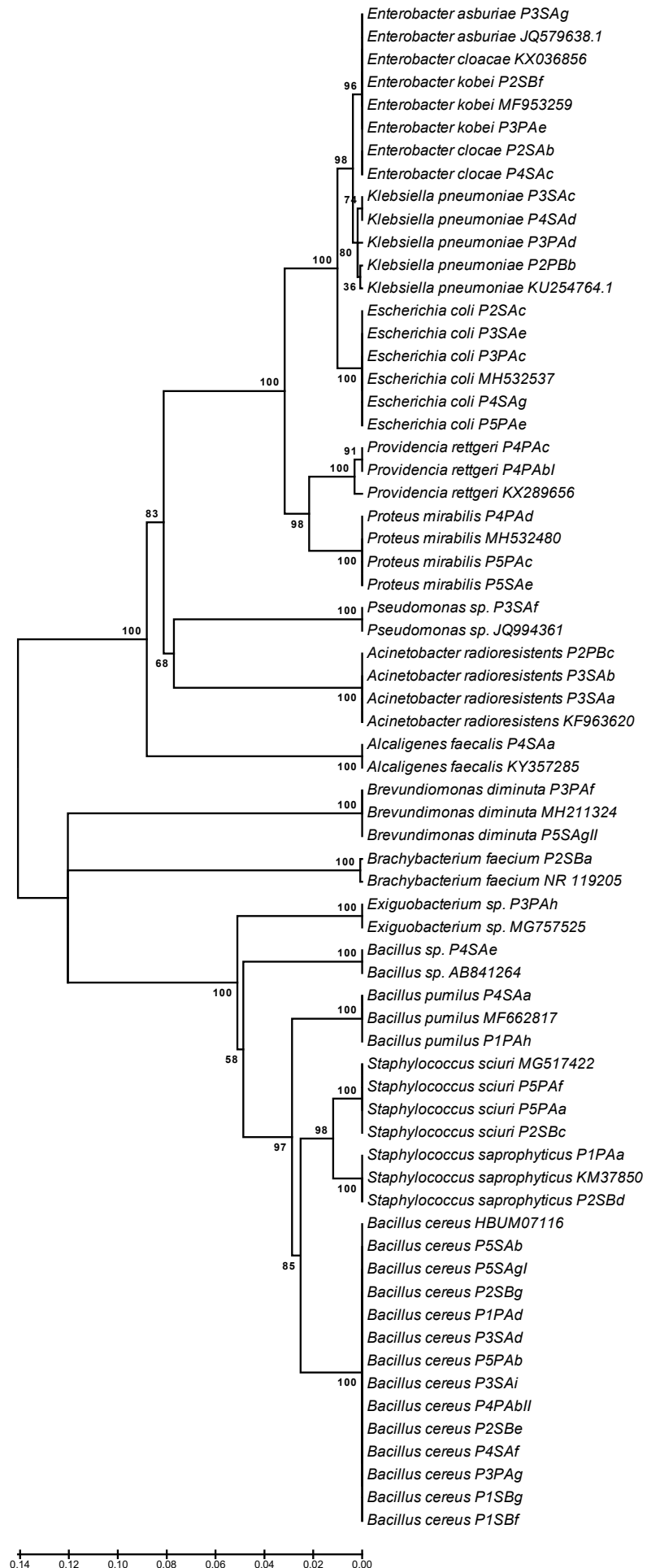


Figura 2: Dendograma gerado a partir das sequências do gene *16S rRNA* de isolados bacterianos obtidos do riacho Cavouco e sequencias referências depositadas no GenBank.



4 CONCLUSÃO

- O riacho Cavouco é um reservatório de bactérias ambientais e de importância clínica, uma vez que foram detectadas espécies de origem ambiental e hospitalar;
- A técnica fenotípica foi eficiente para o isolamento das bactérias, porém não possibilitou a identificação taxonômica dos isolados;
- As técnicas moleculares, sequenciamento do gene *16SrDNA* e MALDI-TOF-MS, foram eficientes para caracterizar a identidade molecular dos isolados;
- A técnica MALDI-TOF-MS apresenta-se como uma alternativa viável na caracterização microbiológica de ambientes aquáticos impactados;
- O acervo de bactérias (bacterioteca) de ambientes impactados corresponde a um local alternativo de material biológico e/ou genético que pode ser utilizado como recurso para monitorar um ambiente possivelmente impactado e identificar a disseminação de patógenos.
- O Hg^{2+} pode atuar como um fator de *stress* para a maioria dos isolados de *K. pneumoniae*, estimulando a formação de biofilme e consequentemente aumentando a estratégia de sobrevivência;
- Os isolados de *K. pneumoniae* investigados correspondem a clones distintos evidenciados inicialmente pela diferença na capacidade de formação de biofilme e confirmados pela técnica de tipagem ERIC-PCR, correspondendo, portanto a populações distintas no ecossistema analisado;
- Os resultados da identificação fenotípica e molecular revelam a diversidade microbiana do ambiente investigado e demonstra a necessidade da implantação de um programa de gestão de resíduos e efluentes na instituição, visando a diminuição e disseminação do impacto ambiental e o risco à saúde pública.

REFERÊNCIAS

- 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**, v. 31 n.3, 2016.
- ABOU-SHANAB, R.; VAN BERKUM, P.; ANGLE, J. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere**, v. 68, p.360–367, 2007.
- ADARSH, V.K.; MISHRA, M.; CHOWDHURY, S.; SUDARSHAN, M.; THAKUR, A.R.; RAY, C.S. Studies on metal microbe interaction of three bacterial isolates from east Calcutta wetland. **Journal of Biological Sciences**, v.7, p.80-88, 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. Panorama da qualidade das águas superficiais. 2012b.
- AGUIAR, M.R.M.P.; NOVAES, A.C.; GUARINO, A.W.S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v.25, n.6b, p.1145-1154, 2002.
- AL-BAHRY, S.N.; MAHMOOD, I. Y.; AL-KHAIFI, A., ELSHAFIE, A.E.; AL-HARTHY, A. Hability of multiple antibiotic resistant bacteria in distribution lines of treated sewage effluent used for irrigation. **Water Science and Technology**, v.60, n.11, p.2939-2948, 2009.
- ALI ABADI, F.S.; LEES, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.307-313, 2000.
- ALONSO, A. et al. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v.3, p.1–9, 2001.
- ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1818–24, 2000.
- ARAÚJO, M. C.; OLIVEIRA, M. B. M. Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, n.3, 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. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24(4):3717-3726, 2017.

BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M. S.; STEPANAUSKAS, R.; McARTHUR, J. V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**, v.14, n.4, p.176-182, 2006.

BARATI, A.; GHADERPOUR, A.; CHEW, L. L. et al. Isolation and Characterization of Aquatic-Borne *Klebsiella pneumoniae* from tropical estuaries in Malaysia. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.13, n. 426, 2016.

BARKAY, T; MILLER, S.M.; SUMMERS, A.O. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Review**, v.27, p.355–384, 2003.

BARRETO, S.; ZAMBRANO, M.; ARAQUE, M. Phenotypic variations of susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* strains of nosocomial origin and their association with biofilm formation. **Investigacion Clinica**, v. 50, n. 2, p. 221–229, 2009.

BELLIFA, S.; HASSAINE, H.; BALESTRINO, D. et al. Evaluation of biofilm formation of *K. pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, p.5558–64, 2013.

BLINDAUER, C. A.; HARRISON, M. D.; ROBINSON, A. K., et al. Multiple bacteria encode metallothioneins and Smt A-like zinc fingers. **Molecular Microbiolog**, v.45, p.1421–1432, 2002.

BONTIDEAN, I.; LLOYD, J. R.; HOBMAN, J. L.; et al. Bacterial metal-resistance proteins and their use in biosensors for the detection of bioavailable heavy metals. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.79, p.225–229, 2000.

CABRAL, A. B.; MELO, R. C. A.; MACIEL, M. A. V.; LOPES, A. C. S. Multidrug resistance gene, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n.5, p.572-578, 2012.

CAILLE, O.; ROSSIER, C.; PERRON, K. A copper-activated two-component systems interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.4561-4568, 2007.

CANELA, M. C.; “Determinação de Mercúrio”, UNICAMP, 1995. Horvat, M.; “**In Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances**”, Baeyens, W. et al., p 1, 1996.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, p.53, n.6, p.2227-2238. 2009.

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**, v. 2, n 1, 8-15, 2014.

CLARKSON, T. W. Mercury: major issues in environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v.100, p. 31–38, 1993.

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n.4, p. 840-862, 2004.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº 357, de 18 de março de 2005. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 24.09.2017.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVER, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: metodological innovation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.71, n.3, p. 491-503, 1999.

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

DAVIS, G.S.; WAITS, K.; NORDSTROM, L.; WEAVER, B.; AZIZ, M., et al. Intermingled *Klebsiella pneumoniae* populations between retail meats and human urinary tract infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, p. 892–9, 2015.

DEL CASTILLO, I.; VIZAN, J. L.; RODRÍGUEZ-SÁINZ, M. C.; MORENO, F. An unusual mechanism for resistance to the antibiotic coumermycin-A1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.8860–8864, 1991.

DOELMAN, P.; JANSEN, E.MICHEL, M.; VAN, T.M. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by sensitivity-resistance index, na ecologically relevant parameter. **Biology and Fertility of Soils**, v.17, p.177-84, 1994.

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, 2014.

FATIMA, S.; MUHAMMAD, I.N.; KHAN, M.N.; JAMIL, S. Phenotypic expression and prevalence of multi drug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Karachi, Pakistan. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.31, n.4, p-1379-1384, 2018.

FOSTER, I.D.L.; CHARLESWORTH, S.M. Heavy metals in the hydrological cycle: trends and explanation. **Hydrological Processes**, v.10, p.227-261, 1996.

FREITAS, J. H. E. S.; SANTANA, K. V.; NASCIMENTO, A. C. C.; et al. Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**, v.163, p.133-141, 2016.

FUGIMORE, H.; KIYONO, M.; NOBUHARA, K.; PAN-HOU, H. Possible involvement of red pigments in defense against mercury in *Pseudomonas* K-62. **FEMS Microbiology Letters**, v.135 n.2-3, p.317-321, 1996.

GELDREICH, E.E. The bacteriology of water. In: **Microbiology and microbial infections**. 9. ed. London: Arnold, 1998.

GHOSH, A.; SINGH, A.; RAMTEKE, P. W.; SINGH, V. P. Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.272, p.6–11, 2000.

GIOVANELLA, P.; CABRAL, L.; COSTA, A.P. et al. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.140, p.162-169, 2017.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Rev FAPAM*, v.2, n.1, 2003.

GUSATTI, C.; FERREIRA, A.E.; FUENTEFRIA, D.B.; CORÇÃO, G. Resistance to beta-lactams among *Acinetobacter* spp. isolated from hospital sewage in Southern Brazil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p. 183-187, 2009.

H.C. FLEMMING; J. WINGENDER. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p. 623–633, 2010.

HENNEQUIN, C.; AUMERAN, C.; ROBIN, F.; TRAORE, O.; FORESTIER, C. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2123–30, 2012.

HIRSCH, R.; TERNS, T.; HABERER, K.; KRAZTZ, K.L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science Total Environment**, v.225, p.109-18, 1999.

HOBMAN, J.L.; BROWN, N.L. Bacterial Mercury Resistance Genes. **Metal Ions in Biological Systems**, v.34, p.527-568, 1997.

JAN, A.T.; MURTAZA, I.; ALI, A.; HAQ, Q.M.R. Mercury Pollution: an Emerging Problem and Potential Bacterial Remediation Strategies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.1529-1537, 2009.

JAN, A.T.; AZAM, M.; CHOI, I.; ALI, A.; MOHD; HAQ, Q.M.R. Analysis for the presence of determinants involved in the transport of mercury across bacterial membrane from polluted water bodies of India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p.55-62, 2016.

JARDIM, W.F. Contaminação por mercúrio: fatos e fantasias. **Ciência Hoje**, v.7, n.41, p.78-79, 1988.

KAPLAN, J. B.; IZANO, E. A.; GOPAL, P.; et al. Low Levels of β -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. **American Society For Microbiology – mBio**, v. 3, n. 4, p. 1–14, 2012.

KHOSRAVI, A.D.; HOVEIZAVI, H.; MOHAMMADIAN, A., et al. Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.31. n3, 2016.

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**, v. 7, 2016.

LEVY, S.B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. **Journal Applied Microbiology**, v.92, p.65–71, 2002.

LI, B.; ZHAO, Y.; LIU, C; et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology**, v.9, p.1071-81, 2014.

LINDE, A.R; ARRIBAS, P.; SANCHEZ-GALAN, S.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Eel (*Anguilla anguilla*) and Brown Trout (*Salmo trutta*) target species to assess the biological impact of trace metal pollution in freshwater ecosystems. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.31, p.297-302, 1996.

LIU, S.Y.; ZHANGS, S.N.; GENG, T.Y.; LI, C.M.; YED, D.; ZHANG, F. ZOU, H. W. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. **Applied Environmental Microbiology**, v.76, p.5972-5976, 2010.

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.

MARQUES, J.J.G.S.M.; CURI, N.; SCHULZE, D.G. Trace elements in Cerrado soils. In: ALVAREZ, V.H.; SCHAFFER, C.E.G.R. et al., *Tópicos em Ciência do Solo* (Topics in Soil Science), Viçosa: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Cap.3 p.103-142, 2002.

MARTINEZ, J. J.; MULVEY, M. A; SCHILLING, J. D.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **The EMBO journal**, v. 19, n. 12, p. 2803–12, 2000.

MARTINS, V.V; ZANETTI, M.O.B.; PITONDO-SILVA, A.; STEHLING E.G. Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. **Environmental Science and Pollution Research**, v.21, p.5873-5878, 2014.

MATSEN, J. M., SPINDLER J. A.; BLOSSER, R.O. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. **Applied Microbiology**, v.28, n.4, p.672-8, 1974.

MAXSON, P. In: **Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales: Atmospheric Processes and Human Exposures around the world**; Pirrone, N.; Mahaffey, K.R., eds.; Springer: New York, Cap.2, 2005.

MCARTHUR, J.V. AND TUCKFIELD, C. Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.3722–3726, 2000.

MAHBUD, K.R.; KRISHNAN, K.; ANDREWS, S.; VENERT, S.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Bio-augmentation and nutriente amendmente decrease concentration of Mercury in contaminated soil. **Science Total Environmental**, v. 576, p. 303-309, 2017.

MCINTOSH, D.; CUNNINGHAM, M.; JI, B.; FEKETE, F. A, et al. Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, n.6, p.1221-1228, 2008.

MELO, R.C.A.M.; BARROS, E.M.R.; LOUREIRO, N.G.; MELO, H.R.L; MACIEL, M.A.V.; LOPES, A.C.S. Presence of *fimH*, *mrkD*, and *irp2* virulence genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology**, v. 69, p.824-831, 2014.

MILLIS, J. P.; TALATI, N. J.; ALBY, K.; HAN, J.H. The epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization and infection among long-term acute care hospital residents. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.37, n.1, p.55-60, 2016.

MIRE, C. E., TOURJEE, J. A., O'BRIEN, W. F., RAMANUJACHARY, K. V.; HECHT, G. B. Lead precipitation by *Vibrio harveyi*: evidence for novel quorum-sensing interactions. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, n.2, p.855–864, 2004.

MOGHADAMPOUR, M.; REZAEI, A.; FAGHRI, J. The emergence of *bla*OXA-48 and *bla*NDM among ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in clinical isolates of a tertiary hospital in Iran. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.19, p.1-10, 2018.

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, n.11, p.307, 2007.

MUKHOPADHYAY, R.; ROSEN, B.P. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. **Environmental Health Perspectives**, v.110, p.745–748, 2002.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PEALLER, M. **Medical Microbiology**. 5 ed. Elsevier Mosby, USA, 2005.

NIES, D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.27, p.33-39, 2003.

NORDMANN P, CUZON G, NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v.9, p.228–36, 2009.

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**, v.30, 2017.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37 n.6, p.1661-1669, 1999.

PALLERONI, N. J. Pseudomonas classification – a new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, 64: 231-251, 1993.

PAZ, V.P.S.; TEODORO, R.E.F.; MENDONÇA, F.F. Recursos hídricos, agricultura irrigada e meio ambiente. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.3, p.465-473, 2000.

PÉREZ-VALDESPINO, A.; CELESTINO-MANCERA, M.; VILLEGAS-RODRIGUEZ, V.L.; CURIEL-QUESADA, E. 2013. Characterization of Mercury-resistant clinical Aeromonas species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n.4, p.1279-1283.

PERRIN, C; BRIANDET, R.; JUBELIN, G.; LEJEUNE, P. Nickel promotes biofilm formation by Escherichia coli K-12 strains that produce curli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.1723-1733, 2009.

PODDA, F. P., ZUDDAS, A., MINACCI, M. & BALDI, F. 2000 Heavy metal coprecipitation with hydrozincite $[Zn_5(CO_3)_2(OH)_6]$ from mine waters caused by photosynthetic micro organisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5099–5098.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens : Epidemiology , Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, 1998a.

PODSCHUN, R; ULLMANN, U. Bacteriocin typing of environmental Klebsiella isolates. **Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin**, v.195. n.1, p.22-26, 1993.

POULIQUEN, H.; LE, B. Sorption of oxolinic acid and Tetracycline to marine sediments. **Chemosphere**. v.33. p.801-15, 1996.

PRADO, T.; PEREIRA, W. C.; SILVA, D. M.; SEIKI, L. M.; CARVALHO, A. P.; ASENSI, M. D. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in effluents and sludge of hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n.1, p. 136-141, 2008.

QUINTELAS, C.; ROCHA, Z.; SILVA, B.; FONSECA, B.; FIGUEIREDO, H.; TAVARES, T. Biosorptive performance of na Escherichia coli biofilm supported on zeolite NaY for the removal of Cr(VI), Cd(II), Fe(III) and Ni(II). **Chemical Engineering Journal**, v.152, p.110–115, 2009.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. 2 ed. Washington: Taylor & Francis, p. 947, 1995.

RASMUSSEN, L.D.; SORENSEN, S.J. The effect of long-term exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. **Current Microbiology**, v.36, p.291–297, 1998.

RAUCCI, G.D.; POLETTE, M. Subsídios para análise da capacidade de suporte da praia central de balneário Camboriú – SC. Perfil do Usuário In.**XIV Semana Nacional de Oceanografia Rio Grande –RS**. Livro de síntese do evento citado: Furg, p. 117-118, 2001.

RAVICHANDRAN, M. Interactions between Mercury and dissolved organic matter – a review. **FEMS Microbiology Review**, v.55, p.319-331, 2004.

ROBERTS, M.C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v.245, p.195–203, 2005.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; ELSAS, J.D. 1997. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.135-147.

RTOUT, J. D.; THOMSON, K.S.; HANSON, N.D. et. al. Beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.6, p.1350-4, 1996.

RUNCHAROEN, C.; MORADUGARAVAND, D.; BANE, B., et al. Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological link between clinical and environmental *Klebsiella*. **Genome Medicine**. v.9, p.2-10, 2017.

RUIZ, N. The role of *Serratia marcescens* porins in antibiotic resistance. **Microbial Drug Resistance**, v.9, p.257–264, 2003.

SANTOS, A. F.; CAYÔ, R.; SCHANDERT, L.; GALES, A. C. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 3, p. 191-197, 2013.

SARMA, B.; AXHARYA, C.; JOSHI, S.R. *Pseudomonas*: a versatile bacterial group exhibiting dual resistance to metals and antibiotics. **African Journal of Microbiology Research**. v.4, p. 2828-2835, 2010.

SAUGET, M.; VALOT, B.; BERTRAND, X.; HOCQUET, D. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria? **Trends in Microbiology**, 25(6):447-455, 2016.

SCHALK, I.J., HANNAUER, M., BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**, v.13, p.2844–2854, 2011.

SCHWABER, M.J.; NAVON-VENEZIA, S.; SCHWARTZ, D.; CARMELI, Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum- β -lactamases-producing Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p.2137-2139, 2005.

SEIFI K.; KAZEMIAN, H.; HEIDARI, H., et al. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.9, 2016.

SHAKIBAIE, M.R.; JALILZADEH, K.A.; YAMAKANAMARDI, S. M. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes among Gram negative bacteria in sewage and lake water and influence of some physico-chemical parameters of water on conjugation process. **Journal of Environmental Biology**, v.30, n.1, p.45-49, 2009.

SHARPLES, G.J.; LLOYD, R.G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromossomes. **Nucleic Acids Research**, n.18, p.6503-6508, 1990.

SILVER, S. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annual Review of Microbiology**, v.50, n. 69, p.753–789, 1996.

SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions. **Gene**, v.179, p.9–19, 1996.

STAHL, D. A. 1997. Molecular Approaches for the Measurement of Density, Diversity and Phylogeny, Manual of Environmental Microbiology, HURST, C.J., ED., WASHINGTON, DC: **American Society for Microbiology**, p. 102-114, 1997.

STAHLHUT, S. G.; CHATTOPADHYAY, S.; STRUVE, C.; et al. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 6, p. 1941–50, 2009.

STEPANAUSKAS, R. et al. Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. **Environmental Science & Technology**, v.39, p.3671–3678, 2005.

SUMMERS, A.O.; WIREMAN, J.; VIMY, M. J. et al. Mercury released from dental silver fillings provokes an increase in mercury-resistant and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. **Antimicrobial Agents and Chemotherap**, v.37, p.825–834, 1993.

SUMMERS, A.O. Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. **Clinical Infectious Diseases**, v.34, p.S85–S92, 2002.

TAGA, M.E., BASSLER, B.L. Chemical communication among bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100 (Suppl), p.14549–14554, 2003.

TANSARLI, G.S.; PAPAPARASKEVAS, J.; BALASKA, M.; et al. Colistin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: evolution over 15 years and temporal association with colistin use by time series analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**. V. S0924-8579, n.18, p.30179-1, 2018.

TAVARES, T.M.; CARVALHO, F.M.; Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. **Revista Química Nova**, v. 15, n.2, p. 147 - 154 ,1992.

TENDENCIA, E.A.; DE LA PENA, L.D. Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, v.213, n.1, p.13, 2002.

TRABULSI, L.B.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5ed. São Paulo: Atheneu, p. 180, 2008.
TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

TUMBARELLO, M.; SANGUINETTI, M.; MONTUORI, E. et al., Predictors of mortality in bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing

Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.1987–1994, 2007.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubactéria and application to fingerprint of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, n.24, p.6823-6831, 1991.

VIRGA, R.S.P.; GERALDO, L.P.; SANTOS, F.H. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. **Ciência Tecnologia e Alimentação**, v.27, n.4, p. 779-785, 2007.

VON BODMAN, S.B., BAUER, W.D., COPLIN, D.L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.455–482, 2003.

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. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.36, n.5, p.807-812, 2017.

WEGENER, H.C.; MOLLER, N.F. Reducing the use of antimicrobial agents in animals and man. **Journal of Medical Microbiology**, v.49, p.111-113, 2000.

WHO (2014). Water Sanitation and Health. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases. Acesso em: 24.09.2017.

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.

WILSON, L.; SHARP, P.M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in Escherichia coli: evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, v.6, p.1156-1168, 2006.

WOODFORD, N.; WAREHAM, D.W.; GUERRA, B.; TEALE, C. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, p.287-291, 2014.

WOODSON, S. A.; LEONTI, N. B. Structure and dynamics of ribosomal RNA. **Current Opinion in Structure Biology**, v. 8, n.3, p. 294-300, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Trace elements in human nutrition and health. Geneva: WHO, 1996.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1451–1470, 2005.

WU, X.; SANTOS, R.S.; FINK-GREMMELS, J. Cadmium modulates biofilm formation by Staphylococcus epidermidis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.12, p. 2878-2894, 2015.

YANG, Q.E.; AGOURI, S.R.; TYRRELL, J.M.; WALSH, T.R.. Heavy metal resistance genes are associated with blaNDM-1 and blaCTX-M-15 Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.62, n.5, p. e02642-17, 2018.

YEGNESWARAN, B.; NUMSUWAN, W.; ALCID, D. Incidence of Carbapanemase Resistance Gene (KPC) among *Klebsiella pneumoniae* isolates and its Clinical Implications. **The International Journal of Infectious Disease**, v.14S1, 2010.

ZHANG, X.-X.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 397–414, 2009.

ZHAO, J.; DANG, H. Coastal Seawater Bacteria Harbor a Large Reservoir of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in Jiaozhou Bay, China. **Microbial Ecology**, v.64, p. 187–199, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A - SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E FORMAÇÃO DE BIFIOLME EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE UM RIACHO URBANO – RECIFE/PE.

Educação Ambiental & Biogeografia / Giovanni Seabra (Organizador). Ituiutaba: Barlavento, 2016. Vol. II. 2762p.

ISBN: 978-85-68066-25-6

1. Educação Ambiental; 2. Capital Natural; 3. Economia Verde
I. SEABRA, Giovanni

Os conteúdos a formatação de referências e as opiniões externadas nesta obra são de responsabilidade exclusiva dos autores de cada texto.

Todos os direitos de publicação e divulgação em língua portuguesa estão reservados à Editora Barlavento e aos organizadores da obra.



Ituiutaba, MG
abril/2016

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE UM RIACHO URBANO – RECIFE/PE- BRASIL

Lívia Caroline de Alexandre ARAÚJO
Doutoranda em Ciências Biológicas da UFPE
livia-caroline@hotmail.com

Sivoneide Maria da SILVA
Mestranda em Ciências Biológicas da UFPE
sivoneidems@gmail.com

Márcia Vanusa da SILVA
Professor Associada do Departamento de Bioquímica da UFPE
marciavanusa@yahoo.com.br

Maria Betânia Melo de OLIVEIRA
Professor Associada do Departamento de Bioquímica da UFPE
maria.bmoliveira@gmail.com

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa em função do lançamento de grandes quantidades de efluentes sem tratamento prévio adequado, afetando diretamente microbiota ali presente. O presente estudo teve como objetivo realizar a identificação molecular, avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e o potencial de formação de biofilme de amostras de *E. coli* isoladas no riacho urbano intensamente impactado, localizado na cidade do Recife-PE. A identificação molecular foi realizada pelo sequenciamento do gene 16SrRNA. Os isolados foram testados quanto à susceptibilidade pelo método de difusão em disco, conforme as normas CSLI (2014), para quinze antimicrobianos. A formação de biofilme foi avaliada em placas de microtitulação, pelo método de Cristal Violeta em diferentes meios de cultura: Luria Bertani Miller (LB Miller), Brain Heart Infusion (BHI) Tryptose Soy Broth (TSB). Todos os isolados foram identificados como *Escherichia coli* e apresentam a capacidade de formar biofilme, entretanto, com intensidades diferentes nos meios testados. Além disso, alguns deles apresentaram resistência aos antibióticos cefotaxima e tetraciclina. A resistência a antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilme das amostras de *E. coli* isolados em um riacho urbano impactado indicam que este ambiente representa um risco potencial à saúde humana.

Palavras-chaves: ecossistemas, impacto ambiental, resistência bacteriana.

ABSTRACT

Aquatic ecosystems have been altered significantly due to the release of large amounts of wastewater without adequate pre-treatment, directly affecting microbiota present there. This study

aimed to carry out the molecular identification, assess the susceptibility profile to antimicrobials and the potential of *E. coli* biofilm formation isolated in heavily impacted urban stream located in the city of Recife-PE. Molecular identification was performed by sequencing of 16S rRNA gene. The isolates were tested for susceptibility using the disk diffusion method, according to CSLI (2014) standards for fifteen antimicrobials. Biofilm formation was assessed in microtiter plates, the Crystal Violet method in different culture media: Luria Bertani Miller (Miller LB), Brain Heart Infusion (BHI) broth Tryptose Soy Broth (TSB). All isolates were identified as *Escherichia coli* and have the ability to form biofilm, however, with different intensities in the tested media. Moreover, some of them were resistant to cefotaxime and tetracycline antibiotics. The antimicrobial resistance and the ability to form biofilms of *E. coli* strains isolated in an impacted urban stream indicate that this environment is a potential risk to human health.

Keywords: ecosystems, environmental impact, bacterial resistance

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa em função de múltiplos impactos ambientais advindos do lançamento de grandes quantidades de efluentes sem tratamento prévio adequado, resultando na escassez dos recursos naturais ainda existentes e afetando diretamente a qualidade de vida dos seres vivos que habitam nesses ecossistemas (FREITAS, et al., 2011; FAGUNDES, 2009).

Outro problema que atinge o ambiente aquático é a contaminação por bactérias resistentes. Essas bactérias vêm sendo observada em vários ambientes aquáticos incluindo rios, áreas costeiras, esgoto doméstico, esgoto hospitalar, sedimentos, águas superficiais, lagos, oceanos e água potável (BAQUERO, 2008) alterando significativamente a microbiota ambiental (CAUMO et. al., 2010).

Entre as bactérias resistentes comumente presentes nesses ambientes, destaca-se a *Escherichia coli* que é o indicador de contaminação de origem fecal mais utilizado (DANELUZ; TESSARO, 2014). *E. coli* é um patógeno que apresenta uma grande variedade de linhagens e fatores de virulência. A grande diversidade genética desse micro-organismo está associada a diferentes mecanismos de adesão e colonização bacteriana (CROXEN E FINLAY, 2010), tornando-os capazes de aderir e interagir com superfícies vivas ou inertes e de formar biofilmes (BOLL et al., 2013; PEIRANO et al., 2013).

Biofilmes são estruturas compostas principalmente de células microbianas e de uma matriz formada por um aglomerado de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Células crescidas em biofilme apresentam algumas propriedades distintas das células planctônicas, uma delas é a resistência aumentada aos antimicrobianos. A estrutura química e física dos biofilmes ou outros

aspectos da sua arquitetura podem ser responsáveis por conferir essa resistência elevada, já que as células no centro de biofilmes ficam protegidas de forças químicas e físicas tais como de antibióticos e de descamação (FLEMMING E WINGENDER, 2010).

Atualmente, as técnicas moleculares fornecem informações que permitem compreender as interações entre os seres vivos e o ambiente (SILVA, et al., 2014). Sendo assim, a identificação de perfis genotípicos distintos pode servir como indicativo da suposta exposição de micro-organismos aos agentes poluidores, que podem alterar as condições normais do meio e influenciar diretamente na dinâmica de sobrevivência desses seres em seus respectivos ecossistemas.

Segundo Araújo e Oliveira (2013) o efeito cumulativo dos resíduos descartados inadequadamente vem provocando mudanças na dinâmica de um riacho urbano da região metropolitana do Recife, afetando a qualidade da água e organismos vivos existentes. Esse riacho deságua no Rio Capibaribe, importante fonte hídrica da maioria das indústrias e de áreas irrigadas para a produção de alimentos no estado de Pernambuco, demonstrando a relevância do tema abordado.

Diante desse contexto, o presente estudo avaliou o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e determinou o potencial de formação de biofilme de amostras de *E. coli* isoladas e identificadas molecularmente de riacho urbano impactado, localizado na cidade do Recife em Pernambuco.

2. METODOLOGIA

2.1 Material biológico e Condições de cultivo

Foram avaliados seis isolados de *E. coli* provenientes de três pontos distintos do riacho: Ponte do Centro de Tecnologia e Geociências – CTG; Ponte da Biblioteca Central – BC e Ponte do laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA. Esses isolados encontravam-se conservados em glicerol -80°C e foram reativados em meio Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a 37°C por 24h, para análises posteriores.

2.2 Identificação molecular pelo sequenciamento do gene 16S rRNA

A extração do DNA total dos isolados de *E. coli* foi realizada mediante a técnica descrita por Sambrook et al (2001). A qualidade do DNA genômico foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, visualizado em transiluminador U.V. e fotodocumentado. O gene do RNA ribossomal 16S (16S rDNA) foi amplificado utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3). A purificação dos produtos seguiu o protocolo do kit de purificação PureLink (Invitrogen) e os amplicons purificados foram sequenciados em aparelho

automático de DNA ABI 3100. Os dados obtidos pelo sequenciamento foram analisados e comparados no banco de dados *Genbank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

2.3 Análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os isolados bacterianos foram testados quanto à susceptibilidade a quinze antimicrobianos, de acordo com suas classes e espectro de ação: Ampicilina (10µg), Cefazolina (30µg), Cefepima (30µg), Cefotaxima (30µg), Cefoxitina (30µg), Cefuroxima (30µg), Meropenem (10µg), Imipenem (10µg), Gentamicina (10µg), Amicacina (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Ácido Nalidixico (30µg), Tetraciclina (30µg), Cloranfenicol (30µg) e Nitrofurantoína (300µg). Os experimentos foram realizados em triplicata por meio do antibiograma, pelo método de difusão em discos, conforme as normas do CLSI (2014) e a cepa *Escherichia coli* UFPEDA 224 foi utilizada como controle de qualidade.

2.4 Avaliação da formação de biofilme

A formação de biofilme dos isolados de *E. coli* (n=6) foi avaliada em placas de microtitulação, pelo método de Cristal Violeta descrito por Stepanovic et al. (2007) em diferentes meios de cultura: Luria Bertani Miller (LB Miller), BHI e Tryptose Soy Broth (TSB). A partir das leituras de densidade óptica (OD), foi determinada a média dos valores da absorbância de cada amostra (ODa) em comparação com a absorbância do controle de esterilidade (ODc). As amostras foram classificadas como fortemente ($4 \times ODc < ODa$), moderadamente ($2 \times ODc < ODa \leq 4 \times ODc$) e fracamente ($ODc < ODa \leq 2 \times ODc$) formadoras de biofilme. Os isolados que apresentaram valores de absorbância igual ou inferior ao controle foram classificados como não produtores de biofilme.

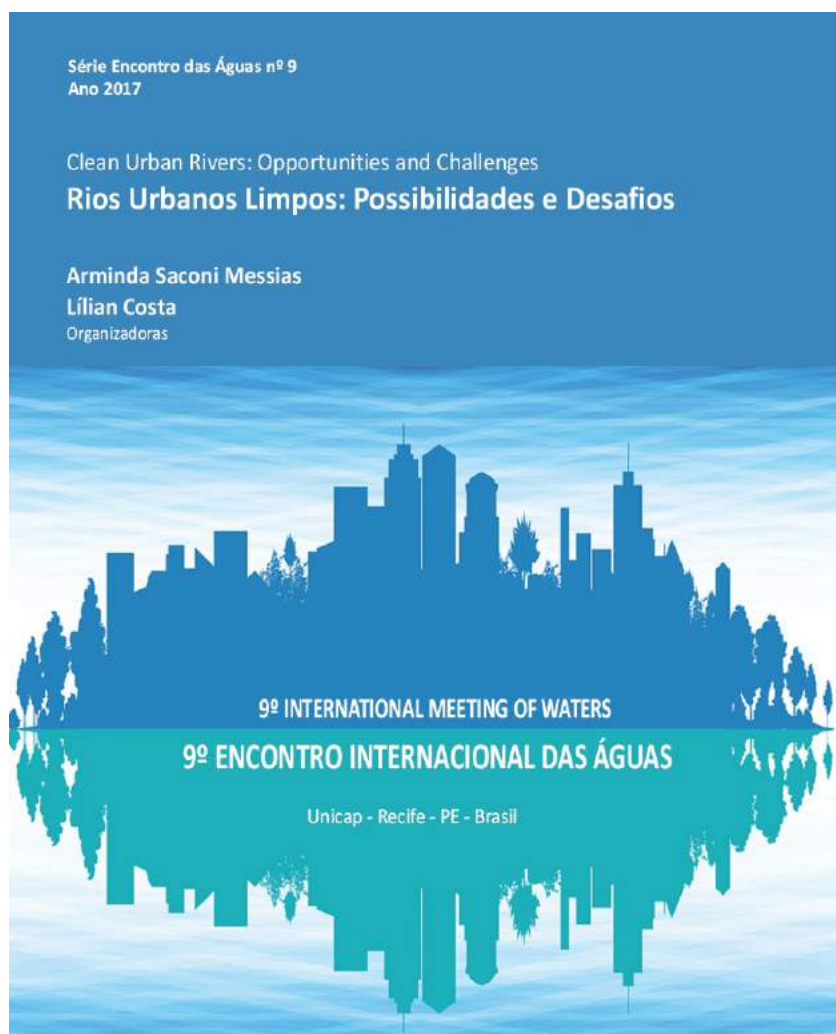
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, primeiramente, foi realizada a identificação molecular dos isolados de *E. coli* por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Esse gene é amplamente utilizado como marcador filogenético, pois apresenta sequências altamente conservadas entre regiões variáveis, está presente e desempenha a mesma função em todos os organismos, não é afetado por mudanças ambientais e apresenta um tamanho suficiente para ser utilizado em inferências taxonômicas (SRINIVASAN et al., 2015). As sequências de 16S já foram determinadas para um número grande de linhagens bacterianas e estão, em sua maioria, depositadas no GenBank (BENSON et al., 2012). Com isso, as sequências previamente depositadas podem ser utilizadas para a comparação com as sequências dos isolados em estudo.

A partir dos resultados obtidos, foi verificado que todos os isolados apresentaram 98-99%

- SP. *Sociedade & Natureza*, Uberlândia, 21 (2): 159-179. 2009.
- FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature reviews / Microbiology* - volume 8 / september, 2010.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nov.*, 33 (3) 667-679. 2010.
- MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*. 9(1):34-9. 2001.
- PEIRANO, G.; MULVEY, G.L.; ARMSTRONG, G. D., et al. Virulence potential and adherence properties of *Escherichia coli* that produce CTX-M and NDM β -lactamases. *J Med Microbiol*. 62:525-530.2013.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd ed.. 2001.
- SILVA, A. C. M. M.; ASCIMENTO, D. L.; MACHADO, R. Z.; FRANCISCA NEIDE COSTA, F. N. Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de amostras de ostras e água por método microbiológico e molecular. *Cienc. anim. bras.*15 (3):362-368. 2014.
- SRINIVASAN, R.; KARAOZ, U.; VOLEGOVA, M.; MACKICHAN, J.; KATO-MAEDA, M.; MILLER, S., et al. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PLoS ONE* 10(2): e0117617. 2015.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.E. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 846-849. 1994.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Journal Compilation APMIS*. 115: 891-9, 2007.
- TEJADA-LLACSA, T. P.; HUARCAYA, J. M.; MELGAREJO, G. C.; GONZALES, L. F.; CAHUANA, J.; PARIR, M.; BOHORQUEZ, H. L.; CHACALTANA, J. Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE em un hospital de referencia nacional. *An Fac*

**APÊNDICE B - ECOSSISTEMA AQUÁTICO IMPACTADO: UM AMBIENTE
PROPÍCIO À DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGENICAS**



R586 Rios urbanos limpos : possibilidades e desafios
[recurso eletrônico] / Arminda Saconi Messias,
organizadora. -- Recife : FASA, 2017.
1 CD-Rom : il. -- (Série encontro das águas ; n.9)
1616 f. : il.

ISBN 978.857.084.332-6

1. Água - Purificação. I. Messias, Arminda
Saconi.

ECOSSISTEMA AQUÁTICO IMPACTADO: UM AMBIENTE PROPÍCIO À DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Macelle Iane da Silva Correia^{1a}, Sivoneide Maria da Silva², Livia Caroline Araújo²,
Ana Vitoria Araújo Lima³, Maria San Miris Lopes de Oliveira⁵, Fernanda Cristina de
Lima Pinto Tavares^{1b}, Márcia Vanusa da Silva⁴, Maria Betânia Melo de Oliveira⁴

^{1a} Graduanda em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. macelleyane@hotmail.com

^{1b} Professora Adjunto do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
fernanda_nutri2000@yahoo.com

² Pós-graduanda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
sivoneidems@gmail.com; livia-caroline@hotmail.com

³ Pós-graduanda do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia do Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. ana.vitorialima@hotmail.com

⁴ Professora Associada do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
marciavanusa@yahoo.com; maria.bmoliveira@ufpe.br

⁵ Graduanda em Ciências Biológicas Licenciatura da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
sanmirislopes@hotmail.com

RESUMO

O número de bactérias resistentes vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. O objetivo do presente trabalho foi confirmar a identidade fenotípica de dois isolados bacterianos: *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida* obtidos de um ambiente aquático impactado em Recife-PE, Brasil e avaliar seu perfil de resistência, capacidade de formação de biofilme e implicações na saúde pública. Para confirmar a identidade dos isolados foi amplificado e sequenciado o gene *16S rRNA* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O perfil de resistência foi avaliado para 17 antimicrobianos e a capacidade para formação de biofilmes foi investigada em seis meios de cultura. Os resultados confirmaram a identidade molecular das espécies estudadas e mostraram perfis de resistência distintos entre essas. *P. putida* foi resistente a quatro antimicrobianos (Ampicilina, Cefalotina, Tetraciclina e Trimetropim) e apresentou resistência intermediária a Cefazolina e Ácido nalidíxico. *E. coli* foi resistente apenas a tetraciclina e apresentou resistência intermediária à cefazolina. Os dois isolados foram fracos formadores de biofilme, exceto *P. putida* no meio Brain Heart Infusion (BHI), onde se apresentou como moderado formador. Em conclusão, os dados revelam que o ambiente investigado pode atuar como um reservatório e disseminador de bactérias patogênicas, configurando assim um problema de saúde pública.

Palavras-chave: Resistência; Cavouco; Patógeno; Identidade Molecular.

INTRODUÇÃO

A seleção de bactérias resistentes vem se destacando como um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. A velocidade de disseminação dos genes de resistência, aliado a administração incorreta no uso dos antimicrobianos tem contribuído para o aumento no número de casos (ROCA et al., 2015).

O principal ponto de seleção dessas bactérias corresponde ao ambiente hospitalar (PICAO et al., 2013) e, sua disseminação deve-se, em parte, ao lançamento de dejetos

que podem corroborar para o impacto ambiental de rios e áreas costeiras, esgoto doméstico, esgoto hospitalar, sedimentos, águas superficiais, lagos, riachos, oceanos e solo (MONTEZZI et al., 2015). Nessa ocasião, a água constitui não somente um meio de disseminação desses micro-organismos, mas também a via pela qual genes de resistências podem ser introduzidos em bactérias naturais alterando a microbiota ambiental. Além disso, nesses ambientes pode ser observada a formação de biofilme bacteriano estimulada por condições de estresse do ambiente, devido a presença de antibióticos e metais pesados (WU et al., 2015).

Rios e riachos são os ecossistemas de água doce que mais têm sido influenciados pela poluição ambiental. Vários autores vêm alertando para os sérios riscos e consequências da contaminação desses ecossistemas. Algumas pesquisas abordam os impactos sobre a fauna aquática, enquanto outras avaliam a carga poluidora e determinam as concentrações letais e subletais de diferentes substâncias, bem como suas alterações na dinâmica das cadeias alimentares aquáticas (PENATTI; GUIMARÃES, 2011) e a disseminação de micro-organismos resistentes (MONTEZZI et al., 2015).

O riacho urbano “Cavouco” é um dos afluentes do rio Capibaribe, um dos principais rios do estado de Pernambuco. Em seu trajeto, esse riacho recebe um aporte de carga poluidora de resíduos e efluentes domésticos, clínicos e laboratoriais. Em pesquisas anteriores, Araújo e Oliveira (2013) identificaram uma significativa carga de poluição ao longo do seu percurso. Recentemente, Freitas et al. (2016), verificaram que o uso combinado de sulfato de alumínio com lectinas de sementes de *Moringa oleifera* (Wsmol) é um método eficiente para redução da turbidez e ecotoxicidade nesse ambiente sem resultar em uma elevada concentração residual de alumínio.

O presente estudo confirmou a identidade molecular de dois isolados bacterianos previamente obtidos do riacho Cavouco, verificou o perfil de sensibilidade/resistência a 17 antimicrobianos e avaliou a capacidade de formação de biofilme em diferentes meios de cultura, além de relacionar com suas implicações na saúde pública.

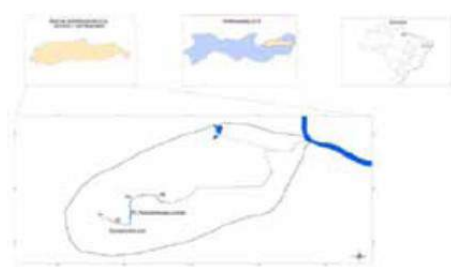
METODOLOGIA

Isolados Bacterianos e Condições de Cultivo

Foram utilizados dois isolados bacterianos (*Eschericia coli* e *Pseudomonas putida*) previamente obtidos e caracterizados fenotipicamente. A Figura 1 mostra a localização de isolamento das bactérias conforme descrição de Araújo e Oliveira (2013).

Os isolados mantidos em glicerol (25 %) - 80 °C, foram reativados em caldo Brain Heart Infusion (BHI - Difco), plaqueados em Agar Miller Hilton e incubados a 37 °C por 24 h.

Figura 1 - Localização do riacho Cavouco (afluente do rio Capibaribe) e distribuição dos isolados bacterianos por pontos analisados



Confirmação Molecular dos Isolados

Para confirmar a identidade molecular de *E. coli* e *P. putida* foi extraído o DNA cromossômico pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 2001). O produto de amplificação do gene *16S rRNA* foi obtido por PCR, utilizando os seguintes oligonucleotídeos: fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al., 1991). A amplificação das amostras foi efetuada em volume final de 25 uL contendo tampão 1X, dNTPs (200 µM), MgCl₂ (1.5 mM) e Taq DNA-polimerase (1U/µL) (Invitrogen), iniciadores (10 pmol/cada) e DNA (10 ng). As reações foram realizadas em termociclador (C1000 ThermalCycler - BioRad), programado com um ciclo inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos consistindo em desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 54 °C por 45 s, e extensão 72 °C por 2 min, finalizando com uma extensão a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram purificados seguindo o protocolo do kit de purificação PureLink (Invitrogen) e sequenciados em sequenciador automático de DNA ABI 3100

utilizando o BigDye Kit (AppliedBiosystems). As sequências do gene *16S rRNA* obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados Genbank (NCBI). Por meio do alinhamento múltiplo, foi gerada uma árvore filogenética baseada em relações de distância, máxima parcimônia e máxima verossimilhança, utilizando o programa MEGA5 – Molecular Evolutionary Genetic Analysis, versão 5.2.

Perfil de Suscetibilidade

Todos os isolados foram testados quanto à susceptibilidade a nove antimicrobianos beta-lactâmicos, da classe penicilina: Ampicilina – AMP (10 µg); cefalosporina: Cefalotina – CFL (30 µg), Cefazolina – CFZ (30 µg), Cefotaxima – CTX (30 µg), Cefoxitina – CFO (30 µg), Cefuroxima – CRX (30 µg), Cefepima – CPM (30 µg); carbapenêmicos: Imipenem – IPM (10 µg), Meropenem – MER (10 µg) e oito antimicrobianos pertencentes às outras classes de antimicrobianos, de acordo com suas classes e espectro de ação: Ácido Nalidíxico – (NAL 30 µg), Ciprofloxacina – CIP (5 µg), Gentamicina – GEN (10 µg), Amicacina – AMI (30 µg), Cloranfenicol – CLO (30 µg), Nitrofurantoína – NIT (300 µg), Tetraciclina – TET (30 µg) e Trimetoprim – TRI (5 µg). Os testes foram realizados em triplicata por meio do antibiograma, pelo método de difusão em discos, conforme as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (2015).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

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 (2014). As medições básicas quantitativas da atividade *in vitro* foram obtidas a partir da leitura de densidade óptica (DO) com auxílio de um leitor de microplacas a 600 nm.

Formação de Biofilme

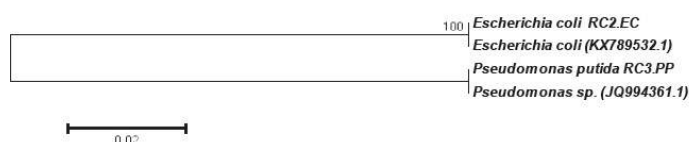
Para avaliar o potencial de formação de biofilme foram realizados experimentos em placas de microtitulação, pelo método de Cristal Violeta descrito por Stepanovic et al. (2007), em diferentes meios de cultura: Luria Bertani Miller (LB), Tryptose Soy Broth (TSB), Brain Heart Infusion (BHI), além de todos os meios suplementados com 1% de

glicose. A partir das leituras de densidade óptica (DO), foi determinado 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 fortemente ($4x DO_c < DO_a$), moderadamente ($2x DO_c < DO_a \leq 4x DO_c$) e fracamente ($DO_c < DO_a \leq 2x DO_c$) formadoras de biofilme.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências do gene *16S rRNA* (aproximadamente 1.500 bp) para os isolados investigados foram alinhadas e comparadas com as sequências depositadas na base de dados GenBank. Verificou-se que essas sequências apresentam um elevado grau de similaridade genética (98-99%) com as já depositadas, confirmando a identificação fenotípica das espécies (Figura 2). De acordo com Stackebrandt e Goebel (1994), para confirmar a identidade molecular de uma espécie a sequência de *16S* deverá apresentar similaridade igual ou superior a 97 %.

Figura 2 - Dendograma comparativo entre as sequências de *16S rRNA* dos isolados obtidos no riacho cavouco e as sequências depositadas no GenBank



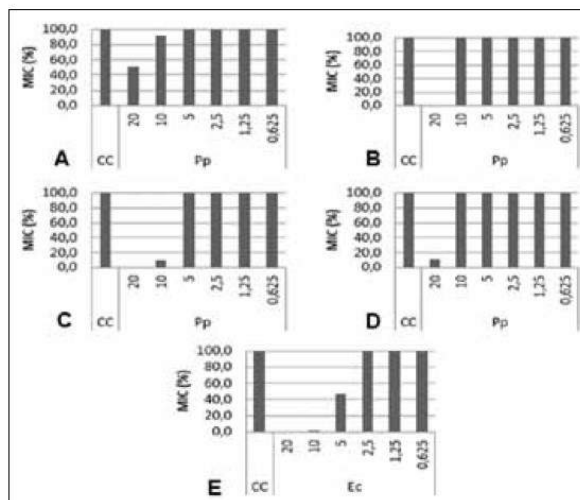
Uma vez confirmada a identidade bacteriana, os isolados foram avaliados quanto ao perfil de suscetibilidade/resistência e mostraram respostas distintas aos antimicrobianos. *P. putida* apresentou resistência à Ampicilina, Cefalotina, Tetraciclina e Trimetoprim, e resistência intermediária a Cefazolina e Ácido Nalidixico, sendo encontrados nessa espécie os resultados mais expressivos no teste de determinação da CIM. *E. coli* foi resistente apenas a Tetraciclina e apresentou resistência intermediária à cefazolina. Esses resultados encontram-se na Tabela 1 e a CIM para os antimicrobianos aos quais os isolados se mostraram resistentes encontra-se na Figura 3.

Tabela 1 - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados de *Pseudomonas putida* e *Escherichia coli*

Agente Antimicrobiano	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Escherichia coli</i>
AMP	RESISTENTE	SENSÍVEL
CLO	SENSÍVEL	SENSÍVEL
IMP	SENSÍVEL	SENSÍVEL
CRX	SENSÍVEL	SENSÍVEL
NIT	SENSÍVEL	SENSÍVEL
GEN	SENSÍVEL	SENSÍVEL
CFZ	INTERMEDIÁRIO	SENSÍVEL
CFL	RESISTENTE	SENSÍVEL
NAL	INTERMEDIÁRIO	SENSÍVEL
CIP	SENSÍVEL	SENSÍVEL
CFO	SENSÍVEL	SENSÍVEL
TRI	RESISTENTE	SENSÍVEL
TET	RESISTENTE	RESISTENTE
COM	SENSÍVEL	SENSÍVEL
MER	SENSÍVEL	SENSÍVEL
AMI	SENSÍVEL	SENSÍVEL
CTX	SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO

AMP(Ampicilina), CLO(Cloranfenicol), IMP(Imipenem), CRX(Ciprofloxacina), NIT(Nitrofurantoína), GEN(Gentamicina), CFZ(Cefazolina), NAL(Ácido Nalidixico), CIP(Ciprofloxacina), CFO(Cefoxitina), TRI(Trimetoprim), TET(Tetraciclina), CPM(Cefepime), MER(Meropenem), AMI(Amicacina), CTX(Cefotaxima).

Figura 3 - Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) nos isolados resistentes de *Pseudomonasputida* (Pp) e *Escherichia coli* (Ec). A: Pp resistente a ampicilina; B: Pp resistente a cefalotina; C: Pp resistente a tetraciclina; D: Pp resistente a trimetopim. E: Ec resistente a tetraciclina



A diferença no perfil de resistência entre diferentes espécies bacterianas é um evento comum descrito na literatura. O potencial dos antimicrobianos pode variar frente aos micro-organismos devido, entre outros fatores, às características estruturais e fisiológicas das espécies, além de fatores como pH, oxigênio do meio e condições de incubação (OSTROKY et al., 2008; MARINS et al., 2011). Outro fator que também pode justificar a diferença no perfil de resistência corresponde ao local de isolamento. No presente estudo, por exemplo, a bactéria mais resistente foi *P. putida*. Esse patógeno foi obtido do ponto 3 do riacho Cavouco. Esse dado é interessante, porque esse local recebe um aporte elevado de resíduos e efluentes provenientes de atividades de ensino e pesquisas nas áreas de Saúde e Biológicas, o que justificaria a maior resistência do isolado, diferentemente do observado para *E. coli* obtido do ponto 2 que apresentou um baixo perfil de resistência justificado, possivelmente, pelas condições ambientais e a tipologia dos resíduos descartados naquele local, sobretudo resíduos domésticos. Esse resultado confirma a utilidade dessa bactéria (*E. coli*) como indicador-de contaminação fecal.

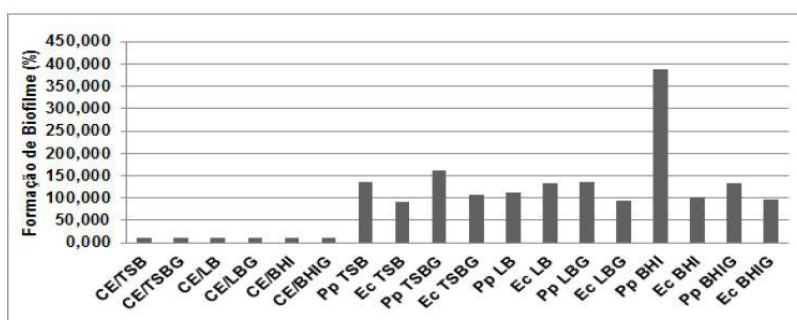
Relatos similares foram encontrados por Baquero (2008), onde os isolados mais resistentes do gênero *Pseudomonas* foram obtidos nos locais mais impactados por resíduos das áreas de saúde, indicando que a resistência observada nessa espécie não depende apenas das características do micro-organismo, mas também do local em que o mesmo foi obtido. Segundo o autor, a introdução e progressiva acumulação no ambiente de agentes antimicrobianos, detergentes, desinfetantes e resíduos de atividades clínicas e laboratoriais podem ter contribuído com a evolução e dispersão de organismos resistentes no local.

A resistência a múltiplas drogas em *P. putida* pode ser explicada pela combinação de diferentes mecanismos agindo de forma conjunta em um mesmo isolado ou, às vezes, a ação de um único e potente mecanismo de resistência. Dados similares já foram descritos para outras espécies, a exemplo do que se encontra em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (ZAVASCKI et al., 2010). Este achado é um indicativo de que o riacho Cavouco está sendo reservatório de micro-organismos patogênicos e que ações de monitoramento e intervenções no lançamento de dejetos urbanos nesse ambiente são necessárias, uma vez que o impacto de bactérias resistentes em ambientes impactados representa um grave problema de saúde pública de grande

amplitude médico-socioambiental. Porém, a resistência não é um fator determinante ou exclusivo para a sobrevivência da bactéria nesses ambientes. Outros mecanismos alternativos, como: a capacidade de aderência em superfícies de contato, facilitando a formação de biofilme pode ser utilizada como estratégia de sobrevivência (DOUTERELO et al., 2016).

No presente estudo, foi avaliada a capacidade dos isolados bacterianos de formar biofilmes em diferentes meios de cultura. De acordo com os resultados obtidos, ambas as espécies foram fracas formadoras de biofilme, com leve formação observada apenas em *P. putida* com maior intensidade no meio BHI (Figura 4).

Figura 4 - Formação de biofilme em diferentes meios. CE (Controle de esterilidade); Pp (*Pseudomonas putida*); Ec (*Escherichia coli*); TSB (Tryptose Soy Broth); TSBG (Tryptose Soy Broth + 1 % de glicose); LB (Luria Bertani Miller); LBG (Luria Bertani Miller + 1 % de glicose) BHI (Brain Heart Infusion); BHIG (Brain Heart Infusion+ 1 % de glicose). IG (Brain Heart Infusion + 1 % de glicose)



Esse dado corrobora com dados descritos na literatura de que a capacidade de formar biofilmes possibilita a bactéria um arcabouço de proteção a ação dos antimicrobianos tornando-as mais resistentes (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013), pois além de garantir a sobrevivência do micro-organismo facilita sua disseminação no meio (KRAGH et al., 2016). Estudos adicionais são necessários para melhor compreender a dinâmica de sobrevivência e permanência desses isolados no ambiente investigado.

CONCLUSÃO

1. Em conclusão, apesar das espécies investigadas apresentarem uma baixa ou moderada capacidade de formar biofilme, os resultados aqui apresentados ainda são preocupantes, uma vez que aponta o riacho Cavouco como um disseminador de bactérias patogênicas configurando, portanto, um problema de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. C.; OLIVEIRA, M. B. M. Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. **Rev. Ambient. Água**. v. 8, n. 3, 2013.
- BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 19, p. 260 - 265, Jun. 2008.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement - M100-S24. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2015.
- DOUTERELO, I.; HUSBAND, S.; LOZA, V.; BOXALL, J. Dynamics of Biofilm Regrowth in Drinking Water Distribution Systems. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 82, p. 14, 2016.
- 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**. v. 7, 2016.
- PENATTI, F.; GUIMARÃES, S. Avaliação dos riscos e problemas ambientais causados pela disposição incorreta de resíduos de laboratórios. **Geografia Ensino & Pesquisa**, v. 15, n.1, p. 43-52, 2011