

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Alexandra da Silva Nunes

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LACTOSE NEGATIVAS AMBIENTAIS  
QUANTO À SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E ADERÊNCIA À  
SUPERFÍCIE**

Porto Alegre

2019

Alexandra da Silva Nunes

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LACTOSE NEGATIVAS AMBIENTAIS  
QUANTO À SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E ADERÊNCIA À  
SUPERFÍCIE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gertrudes Corção

Porto Alegre

2019

#### CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Alexandra da Silva  
Caracterização de bactérias lactose negativas  
ambientais quanto à sensibilidade a antimicrobianos e  
aderência à superfície / Alexandra da Silva Nunes. --  
2019.  
58 f.  
Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Gertrudes Corção.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Antimicrobianos. 2. Resistência. 3. Biofilme. 4.  
Fimbrias. I. Corção, Prof. Dr<sup>a</sup> Gertrudes, orient. II.  
Título.

Alexandra da Silva Nunes

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LACTOSE NEGATIVAS AMBIENTAIS  
QUANTO À SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E ADERÊNCIA À  
SUPERFÍCIE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 03 de Dezembro de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sueli Teresinha Van Der Sand - UFRGS

---

Me. Athos Tópor Nunes - UFRGS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gertrudes Corção - UFRGS

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, quero agradecer a Deus por me acompanhar e por me dar forças e saúde para superar todos os momentos difíceis e, assim, finalizar com êxito nesse ano de 2019 a minha graduação em Biomedicina na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. A minha família, minha mãe, que sempre me apoiou e acreditou no meu potencial, além de participar de todos os momentos comigo ao longo dessa jornada que iniciou em 2014. A minha orientadora, Gertrudes Corção, que me ensinou tudo que eu sei hoje sobre Microbiologia e sempre teve tempo e paciência para explicar-me o que era preciso. As minhas colegas do laboratório 222F do Departamento de Microbiologia da UFRGS pelos dias de risadas, pelas autoclaves e pelos momentos juntos inesquecíveis: Jéssica Araújo, Stefani Corrêa, Débora Ribeiro, Aline Müller, Rafaela Silvello e Laura Nunes. A minha amiga e colega, Priscila Silveira, que aturou as minhas reclamações ao longo dessa graduação e pelos diversos momentos de risadas que passamos juntas. As pessoas que conheci e tornaram-se amigos e amigas enquanto estava nas aulas, no laboratório, na faculdade e no estágio curricular. Agradeço a banca por aceitar o convite também e aos órgãos de fomentos que me proporcionaram essa oportunidade maravilhosa.

## RESUMO

A presença de bactérias resistentes a antimicrobianos tem sido evidenciada não somente em ambientes hospitalares, mas também em corpos hídricos. A evolução e a disseminação da resistência bacteriana no ambiente aquático ocorrem, dentre outras formas, por meio da pressão seletiva imposta pelo uso indiscriminado de antibióticos na medicina humana e na produção animal. A maior parte desses compostos não são totalmente metabolizados nos organismos, passam inertes em sistemas tradicionais de tratamento de efluentes e atingem os corpos hídricos receptores. Juntamente com esses antimicrobianos ativos, podem estar presentes, populações de bactérias resistentes que representam o resultado da pressão seletiva no ecossistema em que se inserem. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar e determinar a susceptibilidade a antimicrobianos e capacidade de aderência a superfícies em isolados bacterianos lactose negativos provenientes da Laguna de Tramandaí, Rio Grande do Sul – Brasil.. Amostras da Laguna de Tramandaí foram concentradas por filtração em membrana de nitrocelulose, colocadas sobre ágar Mac Conkey para isolamento de bactérias, as quais foram identificadas por MALDI-TOF. De 392 isolados bacterianos, 16 foram caracterizados como glicose positivos/lactose negativos não *Pseudomonas spp.* e selecionados para o presente estudo, sendo 3 isolados de *Alcaligenes faecalis* e 13 de *Proteus mirabilis*. A caracterização quanto à propriedade de aderência em superfície foi determinada através da quantificação de formação de biofilme pelo método do cristal violeta em microplaca e por aglutinação em lâmina utilizando mananoligossacarídeo comercial (MOS) para pesquisa da presença de fímbria tipo I ou III. A determinação da susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *A. faecalis* foi através da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo dos antimicrobianos amicacina, ceftazidima, ciprofloxacina, doripenem, florfenicol, gentamicina, imipenem, meropenem, sulfametazol/trimetoprim e tetraciclina. A determinação da susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *P. mirabilis* foi através da técnica de disco difusão em ágar dos antimicrobianos amicacina, ampicilina, amoxicilina-clavulanato, ampicilina-sulbactam, aztreonam, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, doxiciclina, ertapenem, gentamicina, imipenem, meropenem, norfloxacina piperacilina-tazobactam e sulfametazol/trimetoprim; e por meio da CIM dos antimicrobianos doripenem, doxiciclina, ertapenem, imipenem, meropenem e tetraciclina. Os resultados demonstraram que os isolados do presente estudo foram fortes formadores de biofilme. Dos 16 isolados selecionados, nove apresentaram fímbria tipo I, dois fímbria tipo III e cinco, nenhuma das fímbrias testadas. A espécie *P. mirabilis* apresentou mais isolados positivos para fímbrias tipo I. Quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, os isolados de *P. mirabilis* apresentaram resistência a doxiciclina e tetraciclina; e os isolados de *A. faecalis* mostraram-se resistente a tetraciclina e sulfametazol/trimetoprim. Onze isolados resistentes foram portadores de fímbrias tipo I ou tipo III e formadores de biofilme fortemente aderente. Os resultados revelam que a Laguna de Tramandaí possui uma população bacteriana pouco diversificada em relação a bastonetes gram-negativos não fermentadores de lactose cultiváveis e que os mesmos apresentaram uma baixa resistência aos antimicrobianos testados. A capacidade de produzir fímbrias e formar biofilme dos onze isolados bacterianos resistentes facilita sua permanência neste ambiente, fazendo com que participem na manutenção de disseminação de genes de resistência a antibióticos.

Palavras chaves: Bactérias. Antimicrobianos. Resistência. Biofilme. Fímbrias.

## ABSTRACT

The presence of antimicrobial resistant bacteria has been observed not only in hospital environments, but also in water bodies. The evolution and dissemination of bacterial resistance in the aquatic environment occur, among other forms, through the selective pressure imposed by the indiscriminate use of antibiotics in human medicine and animal production. Most of these compounds are not fully metabolized in organisms, passing inert into traditional effluent treatment systems and reaching recipient water bodies. Together with these active antimicrobials, resistant bacterial populations that represent the result of selective pressure on the ecosystem in which they operate may be present. The present study aims to characterize and determine the antimicrobial susceptibility and surface adhesion capacity in lactose negative bacterial isolates from Tramandaí Lagoon, Rio Grande do Sul - Brazil. Samples from Tramandaí Lagoon were concentrated by nitrocellulose membrane filtration and placed on Mac Conkey agar, and the isolates were identified by MALDI-TOF. Of 392 bacterial isolates, 16 were characterized as glucose positive/lactose negative not *Pseudomonas* spp. and selected for the present study, 3 isolates were *Alcaligenes faecalis* and 13 *Proteus mirabilis*. Their characterization for surface adhesion property was determined by quantifying biofilm formation by the microplate crystal violet method and by slide agglutination using commercial mannanoligosaccharide (MOS) for the presence of type I or type III fimbriae. Determination of antimicrobial susceptibility of *A. faecalis* isolates was by minimal inhibitory concentration (MIC) using broth microdilution of the amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin, doripenem, florfenicol, gentamicin, imipenem, meropenem, trimethoprim/sulfamethoxazole and tetracycline. Determination of antimicrobial susceptibility of *P. mirabilis* isolates was by antimicrobial disc diffusion technique of amikacin, ampicillin, amoxicillin-clavulanate, ampicillin-sulbactam, aztreonam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, doxycycline, gentamicin, imipenem, meropenem, norfloxacin Piperacillin-tazobactam and trimethoprim/sulfamethoxazole; and by MIC of the antimicrobials doripenem, doxycycline, ertapenem, imipenem, meropenem and tetracycline. The results showed that both bacterial species are strong biofilm builders. Of the 16 isolates selected for the present study, nine presented type I fimbriae, two type III fimbriae and five, none of the tested fimbriae. *P. mirabilis* showed more positive isolates for fimbriae type I. As for antimicrobial susceptibility, *P. mirabilis* isolates showed resistance to doxycycline and tetracycline; and *A. faecalis* isolates were resistant to tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole. Eleven resistant isolates had type I or type III fimbriae and strongly adherent biofilm formers. The results show that Tramandaí Lagoon has a bacterial population little diversified in relation to cultivable lactose non-fermenting gram-negative rods and that they presented low resistance to the tested antimicrobials. The ability to produce fimbriae and biofilm the eleven resistant bacterial isolates facilitates their permanence in this environment, making them participate in the maintenance and spreading of antibiotic resistance genes.

Keywords: Bacteria. Antimicrobials. Resistance. Biofilm. Fimbriae.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO COMPREENSIVA .....</b>	<b>7</b>
1.1	RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	7
1.2	BIOFILME.....	11
1.3	FÍMBRIAS.....	12
1.4	BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS LACTOSE NEGATIVAS CARACTERIZADAS	14
<b>1.4.1</b>	<b>Proteus mirabilis.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Alcaligenes faecalis .....</b>	<b>15</b>
1.5	LAGUNA DE TRAMANDAÍ.....	16
1.6	JUSTIFICATIVA .....	18
1.7	OBJETIVO .....	19
<b>1.7.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>19</b>
<b>1.7.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
	<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “ ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY” .....</b>	<b>47</b>



## 1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

### 1.1. RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Em 1928, Alexander Fleming descobriu o primeiro composto antibiótico, a penicilina, como um produto do fungo *Penicillium notatum*. A disponibilidade da penicilina para uso terapêutico na década de 1940 provocou uma mudança de padrão no tratamento de doenças bacterianas (DAVIES; DAVIES, 2010). Não apenas as doenças infecciosas mortais se tornaram tratáveis, mas a disponibilidade de antibióticos também abriu possibilidades para novos tipos de intervenções médicas, incluindo grandes cirurgias e transplantes de órgãos. Embora bactérias resistentes a antibióticos tenham começado a aparecer logo após a introdução clínica desses compostos, o problema foi limitado e, a princípio, descartado como pouco preocupante (BERGLUND, 2015).

Atualmente, o uso indiscriminado de antibióticos tornou-se um sério problema de saúde global, pois o aparecimento de bactérias resistentes vem aumentando rapidamente (WRIGHT, 2010). Na área clínica, isso se deve ao uso excessivo e inadequado, como prescrição sem infecção bacteriana estabelecida ou não adesão do paciente ao tratamento completo (ALLEN et al., 2010). Já no âmbito veterinário, os antibióticos são utilizados em larga escala como promotores de crescimento e profiláticos em animais, geralmente administrados por adição à ração. Além disso, o seu uso intensificou também na aquicultura e avicultura (BERGLUND, 2015). Os antibióticos veterinários são pouco absorvidos no intestino dos animais e até 90% de alguns desses fármacos empregados são excretados inalterados ou como metabólitos ativos na urina e nas fezes (JIA et al., 2017).

Nos últimos anos, a contaminação por antibióticos é reconhecida como uma poluição ambiental emergente em ambientes aquáticos, devido aos seus potenciais efeitos adversos no ecossistema e na saúde humana (HOA et al., 2011). Uma vez que resíduos de antibióticos não são completamente removidos, eles podem alcançar os corpos hídricos receptores superficiais e subterrâneos por diferentes rotas, como efluentes de estações de tratamento de águas residuais (ETAR), escoamento superficial; infiltração de água usada para fins veterinários e agrícolas; ou lixiviação (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2015). Os resíduos de antibióticos impõem pressão seletiva sobre as populações bacterianas no ambiente, o que resulta na prevalência de bactérias resistentes mesmo em baixas concentrações inibitórias (HOA et al., 2011).

As águas residuais brutas contaminadas por antibióticos liberadas nos ambientes aquáticos frequentemente carregam bactérias patogênicas humanas e animais, além de

bactérias comensais, e muitos desses organismos podem abrigar e atuar como doadores de genes de resistência a antibióticos (ARGs) (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; KRAUPNER et al., 2018). Em águas de praias turísticas no Rio de Janeiro – Brasil observou-se a ocorrência de bactérias produtoras de carbapenemases, sendo o gênero predominantemente *Kluyvera spp.*, produzindo carbapenemases de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) ou de espectro estendido (GES), frequentemente associadas a resistência à quinolona (MONTEZZI et al., 2015). A introdução e o acúmulo progressivo no ambiente aquático de diversos agentes antimicrobianos, detergentes, desinfetantes, resíduos de poluição industrial, como metais pesados, contribuem para a evolução e disseminação de microrganismos resistentes (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008).

A maioria dos genes de resistência a antibióticos é encontrada em elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons, que podem ser transferidos entre diferentes espécies bacterianas por transferência horizontal (KHAN; SÖDERQUIST; JASS, 2019). A transferência de genes em bactérias ocorre em resposta a mudanças no ambiente, resultando em um aumento da diversidade e compatibilidade genética (BANERJEE; RAY; KUMAR, 2016). As bactérias desenvolvem mecanismos diferentes, que podem estar sozinhos ou associados a outros mecanismos de resistência; como produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico, alteração da permeabilidade da membrana que impede ou dificulta a penetração do antibiótico na célula, hiperexpressão de bombas de efluxo ou alteração do sítio alvo de ação (SEKI, 2012).

Os  $\beta$ -lactâmicos são o grupo de antibióticos mais utilizados no tratamento de infecções bacterianas e a causa proeminente de resistência entre bactérias Gram-negativas em todo o mundo (SHAIKH et al., 2015). Esse grupo abrange penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos que se ligam irreversivelmente às proteínas de ligação à penicilina (PBP) necessária para a etapa de transpeptidação na síntese do peptidoglicano para a construção da parede celular. A estabilidade da parede celular bacteriana é essencial para a forma e proteção da célula em ambiente hostil e hipertônico (ZANGO et al., 2019). O motivo mais comum para a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é a expressão de enzimas  $\beta$ -lactamases, codificadas pelos genes *bla*, que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico, resultando em sua inativação (PARTRIDGE, 2015). Esses genes podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos e sua expressão pode ser induzida pelo antibiótico ou ser constitutiva (SEKI, 2012).

Os aminoglicosídeos são potentes antibióticos de amplo espectro com muitas propriedades desejáveis no tratamento de infecções humanas. Essa classe engloba amicacina,

gentamicina, canamicina, neomicina, netilmicina, estreptomicina, tobramicina e paromomicina (TIMILEHIN; OLATOYE; OGUNJOBI, 2019). Eles inibem a síntese proteica ligando-se, com alta afinidade, ao sítio A do RNA ribossômico 16S do ribossomo 30S (PARTRIDGE, 2015). Como resultado dessa interação, o antibiótico promove a má tradução, induzindo a leitura incorreta do códon na entrega do RNA de transferência de aminoácil. Isso causa síntese proteica propensa a erros, permitindo que aminoácidos incorretos se agrupem em um polipeptídeo que é subsequentemente liberado para causar danos à membrana celular e em outros locais (KRAUSE et al., 2016). A resistência aos aminoglicosídeos emergiu entre várias espécies bacterianas, devido à disseminação de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) em elementos genéticos móveis. As AMEs imitam os alvos de rRNA dos aminoglicosídeos e, portanto, podem emparelhar com aminoglicosídeos na substituição da molécula alvo e desativá-los (CAG, 2017).

Os macrolídeos são antibióticos que pertencem a uma família de compostos químicos caracterizada pela presença de um anel macrocíclico de lactona, cuja droga de referência é a eritromicina. Eles são ativos principalmente contra bactérias Gram-positivas e têm apenas atividade limitada contra bactérias Gram-negativas (CONLY; JOHNSTON, 2002). O seu efeito antimicrobiano é através da ligação com o ribossomo bacteriano, mais precisamente a subunidade 50S, promovendo a inibição da síntese proteica. O efeito pode ser bacteriostático ou bactericida, dependendo da concentração e da susceptibilidade do microrganismo (DA SILVA FILHO; PINTO; STEIN, 2015). Os dois mecanismos de resistência mais comuns nos patógenos bacterianos são a afinidade de ligação reduzida do fármaco, devido à modificação do ribossomo bacteriano ou da molécula antibiótica, e o efluxo de macrolídeos, resultante da alteração da permeabilidade da membrana ou da expressão de bomba de efluxo (DINOS, 2017).

As tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos conhecidos por seu amplo espectro de atividade, abrangendo bactérias Gram-positivas e negativas, espiroquetas, bactérias intracelulares obrigatórias e parasitas protozoários (MARKLEY; WENCEWICZ, 2018). Elas atuam na inibição da síntese proteica bacteriana através da sua ligação reversível à subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Desta forma, há inibição da ligação do RNA transportador ao ribossomo e, conseqüentemente, ocorre interferência no aporte e na ligação dos aminoácidos formadores das proteínas (FOLLOWING; THERAPY, 2001). A resistência às tetraciclinas é geralmente atribuída à aquisição de elementos genéticos móveis que transportam genes de resistência específicos à tetraciclina, mutações no local de ligação ribossômica ou mutações

cromossômicas que levam ao aumento da expressão de mecanismos intrínsecos de resistência (GROSSMAN, 2016).

As quinolonas são drogas sintéticas que evoluíram ao longo do tempo e desenvolveram-se a um grupo de grandes antibióticos, através de mudanças estruturais, contendo assim quatro gerações. Elas são muito utilizadas em tratamentos de infecções urinárias e gastroenterites causadas por bactérias Gram-negativas sensíveis e Gram-positivas; em doenças sexualmente transmissíveis, infecções respiratórias e tuberculose (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014). O mecanismo de ação é por inibição das atividades das enzimas DNA girase (topoisomerase II) e da topoisomerase IV. A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior celular e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte bacteriana (CORREIA et al., 2017). Os mecanismos de resistência incluem mutações em uma ou em ambas as enzimas alvo, reduzindo a ligação da droga ao complexo enzima-DNA; mutações de resistência em genes reguladores que controlam a expressão de bombas de efluxo nativas localizadas na membrana bacteriana; e genes de resistência adquiridos por plasmídeo (HOPPER, 2015).

As sulfonamidas estão em uso clínico há anos e a adição de trimetoprim (trimetoprim-sulfonamida) ou ormetoprim (ormetoprim-sulfadimetoxina) é usada para ampliar o espectro e aumentar a atividade antibacteriana. Os principais usos clínicos são para tratamento de infecções urinárias e prostatites. O mecanismo de ação envolve a semelhança química das sulfonamidas com o ácido para-aminobenzóico (PABA) (CAPASSO; SUPURAN, 2014). Elas agem como um substrato falso, competindo com o PABA pela enzima di-hidrofolato-sintase; assim, bloqueiam a síntese do ácido di-hidrofólico (DHFA). Por sua vez, o trimetoprim inibe a síntese do ácido tetra-hidrofólico (THFA), sendo o cofator de folato inibido. O cofator de folato atua como doador de um carbono para a síntese de ácido nucleico (DNA). O resultado do bloqueio da biossíntese da coenzima folato nas bactérias é o crescimento e a divisão interrompidos (KAUFMAN, 2011). Os mecanismos de resistência nessa classe incluem alteração do alvo bacteriano resultante de uma transferência horizontal de genes por plasmídeo e transposons, superprodução das enzimas DHFR (di-hidrofolato redutase) causada por uma mutação pontual ou alteração da permeabilidade da membrana através de mutações na porina ompF (CASTANHEIRA, 2013).

## 1.2. BIOFILME

Biofilmes são agregados estruturados de células bacterianas incorporados em substâncias poliméricas extracelulares (EPS) autoproduzidas, contendo poros e pequenos canais em sua estrutura altamente hidratada, que aderem às superfícies bióticas ou abióticas (HALL; MAH, 2017). Os biofilmes apresentam funções protetoras contra desidratação, infecções por bacteriófagos e agentes antimicrobianos. As características físico-químicas da superfície e a expressão de fatores de virulência dos microrganismos, como a produção de cápsula, fímbrias e síntese de adesinas, são os principais fatores relacionados à formação de biofilme (CUNHA et al., 2019).

Há inúmeras características que diferem células planctônicas de células no estado de biofilmes. Enquanto a primeira é exposta a condições ambientais relativamente uniformes, a segunda é exposta a um gradiente de nutrientes e produtos residuais (HALL; MAH, 2017). Outro aspecto importante é que o interior do biofilme é heterogêneo; sendo assim, há diversos perfis de expressão gênica observados, dando origem a diferenças fenotípicas entre os dois estilos de vida bacterianos (TOYOFUKU et al., 2016). Devido a isso, células de biofilmes são muito menos suscetíveis a agentes antimicrobianos do que suas contrapartes planctônicas (HALL; MAH, 2017; TOYOFUKU et al., 2016).

A formação de biofilme se inicia com as células planctônicas aderindo-se à superfície em um processo chamado de fixação. Essa etapa é muito importante, pois representa uma alteração no estilo de vida do microrganismo (TOYOFUKU et al., 2016). A fixação pode levar apenas alguns segundos para ser ativada e é induzida por sinais ambientais como mudanças nas concentrações de nutrientes, pH, temperatura, concentração de oxigênio, osmolaridade e ferro (APARNA; YADAV, 2008). As superfícies ásperas são mais suscetíveis à formação de biofilme devido à redução das forças de cisalhamento e ao aumento da área de superfície (OLIVEIRA et al., 2018).

A fixação inicial é reversível e os apêndices celulares como flagelos, pili e fímbrias estão envolvidos nessa etapa. No estágio II as células sofrem fixação irreversível e começam a se multiplicar emitindo sinais químicos que intercomunicam as células bacterianas (Quorum sensing) (PETROVA; SAUER, 2012). Uma vez que a intensidade do sinal excede certo nível limiar, os mecanismos genéticos subjacentes à produção de exopolissacarídeos (polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e outros biopolímeros) são ativados, os quais são capazes de aprisionar nutrientes e bactérias planctônicas (DU; BONSU, 2015). Durante o estágio II os agregados celulares são formados e a motilidade diminui

quando esses se tornam progressivamente sobrepostos com uma espessura superior a 10  $\mu\text{m}$  (estágio III) (APARNA; YADAV, 2008).

Quando o biofilme atinge sua espessura final, geralmente maior que 10  $\mu\text{m}$  (estágio IV – maturação), ocorre dispersão celular; ou seja, algumas bactérias desenvolvem o fenótipo planctônico e deixam o biofilme (PETROVA; SAUER, 2016). Nesta fase, as células bacterianas regulam positivamente a expressão de proteínas relacionadas à formação de flagelos, permitindo assim que se movam (JAMAL et al., 2018). A dispersão pode ser ativa, que depende da motilidade celular ou degradação do EPS; ou passiva, que depende de fatores físicos. Essas células dispersas exploram outros nichos e se conectam novamente a uma nova superfície. Assim, a dispersão não é apenas o estágio final do ciclo de vida do biofilme, mas também o início de outro ciclo de vida (MCDOUGALD et al., 2012).

Os biofilmes são clinicamente importantes, pois contaminam tubos endotraqueais, cateteres, implantes médicos, próteses, dispositivos intrauterinos e lentes de contato; além de causar inúmeras infecções que são difíceis de erradicar com sucesso (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). De acordo com o National Institute of Health (NIH), cerca de 80% das infecções em humanos, como endocardite, osteomielite, sinusite, infecções do trato urinário, periodontite e diversas infecções nasocomiais, especialmente as relacionadas à biomateriais, são causadas por microrganismos capazes de formar biofilme (AAWC, 2008).

No ambiente aquático, grande parte das bactérias cresce no estado de biofilmes, devido ao grau de proteção e estabilidade em relação às mudanças do ambiente que o biofilme oferece (PERES, 2011). Os biofilmes são onipresentes e formados em uma ampla variedade de superfícies, incluindo tubulações, sistema de filtragem e distribuição de água potável, superfícies corporais de organismos marinhos e de estruturas artificiais como navios e pontes; gerando diversos problemas operacionais como corrosão das tubulações e perda da qualidade da água (CAIXETA et al., 2012; LEE et al., 2016).

### 1.3. FÍMBRIAS

Fímbrias são estruturas proteicas poliméricas, filamentosas e longas, que estão localizadas na superfície das células bacterianas, possuindo propriedades adesivas nas quais estão envolvidas na aderência específica bacteriana (CALISTO, 2011). A aderência específica desempenha um papel importante na colonização dos tecidos hospedeiros, pois determina qual organismo e qual tecido será colonizado pelas bactérias devido aos receptores presentes em certos tipos de células (COLEMAN; SMITH, 2007). A expressão das fímbrias é variável,

isto é, as bactérias mudam periodicamente entre um estado fimbriado e não fimbriado; como resultado, uma determinada população bacteriana sempre conterá células de ambos os fenótipos (SCHROLL et al., 2010).

Estudos demonstraram que praticamente todas as espécies bacterianas Gram-negativas produzem um ou mais tipos de fímbrias; algumas Gram-positivas mostraram possuir também (COLEMAN; SMITH, 2007). Em bactérias patogênicas, as fímbrias, frequentemente, são fatores de adesão cruciais, que medeiam a ligação as células alvos, evasão do sistema imune do hospedeiro e formação de biofilme (MUNHOZ, 2015). Essas propriedades conferem ao microrganismo maior proteção e por esse motivo, elas são consideradas importantes alvos para drogas, necessitando o melhor entendimento de suas estruturas e mecanismo de montagem (CUSUMANO; HULTGREN, 2009).

As fímbrias tipo I são denominadas fímbrias somáticas ou comuns e são encontradas em muitos membros da família Enterobacteriaceae (BRAVO et al., 2015). Bactérias que possuem esse tipo de fímbria fazem a adesão a glicoconjugados contendo manose presentes nas células hospedeiras e no material da matriz extracelular; podendo essa ação ser bloqueada por D-manose ou  $\alpha$ -metilmanosídio e concanavalina A (FACCO, 2015). Essas fímbrias são codificadas pelo operon *fimAICDFGH* que contém os genes necessários para sua montagem e estrutura (BRAVO et al., 2015). FimA é a principal subunidade estrutural, FimI é necessário para a biossíntese, FimC atua como um acompanhante periplásmico que estabiliza subunidades no periplasma através da formação de complexos distintos, FimD é a plataforma de montagem da membrana externa, FimF e FimG são proteínas adaptadoras e FimH é a adesina localizada na ponta das fímbrias que medeia a adesão de bactérias às moléculas que contêm manose nas superfícies (MURPHY, 2014).

As fímbrias tipo III foram identificadas e caracterizadas pela primeira vez em *Klebsiella pneumoniae*; entretanto, estudos posteriores identificaram esse tipo de fímbria em outras Enterobacteriaceae também. Elas possuem a propriedade de aglutinar eritrócitos pré-tratados com ácido tânico “in vitro” na presença de manose (manose-resistentes) (SCHROLL et al., 2010). As fímbrias do tipo III são codificadas no operon *mrk* por cinco genes: *mrkA*, *mrkB*, *mrkC*, *mrkD* e *mrkF*; podendo ser encontrados no cromossomo bacteriano e, em algumas cepas, também podem ser transmitidos por plasmídeos (MURPHY, 2014). O *mrkA* codifica o principal componente estrutural da proteína que compõe o eixo fimbrial, *MrkB* e *MrkC* são as proteínas acompanhantes e estabilizadoras, *MrkF* é um componente estrutural menor que é incorporado no crescente eixo fimbrial e *MrkD* é a adesina que confere a capacidade das fímbrias de aderir a locais específicos (STAHLHUT et al., 2013).

## 1.4. BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS LACTOSE NEGATIVAS CARACTERIZADAS

### 1.4.1. *Proteus mirabilis*

*Proteus mirabilis* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete que pertence à classe Gammaproteobacteria e tem sido reconhecido como um membro da ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae (ADEOLU et al., 2016). A espécie é bem conhecida devido à produção da enzima urease e capacidade de crescimento espalhado em placas de ágar, o qual é característico de motilidade (ARMBRUSTER et al., 2017). *P. mirabilis* pode ser encontrado em uma ampla variedade de ambientes, incluindo solo, fontes de água e esgoto; entretanto, é predominantemente um microrganismo comensal dos tratos gastrintestinais de humanos e animais (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012).

Os principais fatores de virulência dessa espécie são a produção de urease, que hidrolisa ureia em dióxido de carbono e amônia; a capacidade de ser um forte formador de biofilme; e a expressão de um número surpreendente de fímbrias (ARMBRUSTER et al., 2017). Particularmente, essa espécie bacteriana codifica 17 operons fimbriais, sendo a fímbria mais bem estudada a Proteus-like (MR/P) resistente à manose, cuja expressão é variável e está relacionada com a formação de biofilme (SCAVONE, 2016; MELO, 2010). Outras fímbrias como a PMF (fímbria *P. mirabilis*) e UCA (adesina celular uroepitelial) têm sido relacionadas à infecção do trato urinário. (SCAVONE et al., 2016). A bactéria também pode apresentar um elemento integrativo e conjugativo denominado ICEP<sub>mI</sub> que pode se autorreplicar e se autotransferir para outras cepas e espécies, transferindo genes de virulência e resistência a antibióticos (FLANNERY; ANTCZAK; MOBLEY, 2011).

*P. mirabilis* é capaz de causar uma variedade de infecções nos humanos em feridas, olhos, trato gastrointestinal e trato urinário (ARMBRUSTER et al., 2017). Um estudo realizado na Polônia isolou duas cepas de *P. mirabilis* da urina e das fezes de um paciente, e através de métodos sorológicos e moleculares, constataram que uma cepa se originou de outra; possuindo o mesmo potencial de virulência, pois eram clones de propagação causando autoinfecção (DRZEWIECKA et al., 2008). Contudo, esta bactéria é mais observada em infecções do trato urinário associadas ao cateter (CAUTI). Nessa condição, ocorre infecção pelo *P. mirabilis* que hidrolisa a ureia presente na urina em dióxido de carbono e amônia, fornecendo uma abundante fonte de nitrogênio enquanto, conseqüentemente, aumenta o pH da urina, facilitando a precipitação de íons polivalentes (cálcio e magnésio), resultando na formação de cristais de estruvita e apatita que ficam presos no desenvolvimento de um denso biofilme (NZAKIZWANAYO et al., 2016).



À medida que esse processo progride, o biofilme gradualmente se torna mineralizado, levando ao desenvolvimento de extensas estruturas cristalinas que ocasionam incrustação, bloqueio do cateterismo uretral e trauma na mucosa da bexiga e da uretra após a remoção do cateter (WILKS; FADER; KEEVIL, 2015). Se o bloqueio for despercebido, pode levar ao refluxo de urina infectada para o trato urinário superior e ao aparecimento de complicações clínicas graves, incluindo pielonefrite, septicemia e choque. *P. mirabilis* também é extremamente difícil de eliminar, uma vez estabelecido no trato urinário cateterizado e, muitas vezes, responde mal à antibioticoterapia convencional (NZAKIZWANAYO et al., 2016).

Além do mais, esse microrganismo possui capacidade de exibir vários mecanismos de resistência a antimicrobianos. Isolados clínicos de *P. mirabilis* do noroeste da Argélia mostraram-se resistente a antibióticos importantes como amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefotaxima, gentamicina e ciprofloxacina, os quais continham genótipo ESBL (*blaCTX-M-2*) e AmpC/ESBL (*blaCMY-2/blaTEM-1*), além de todos apresentarem algum gene *AME* (gene de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos) (BOUDJEMAA et al., 2019). Recentemente, genes de resistência a antimicrobianos adquiridos por elementos genéticos móveis estão surgindo nessa espécie. Um estudo realizado em um isolado clínico de *P. mirabilis* foi identificado a presença do gene *blaOXA-58*, uma carbapenemase classe D, que é difundido entre as espécies de *Acinetobacter* resistentes ao carbapenem; revelando que possivelmente esse gene tenha sido transmitido por plasmídeo ao isolado (GIRLICH; BONNIN; BOGAERTS, 2017).

#### **1.4.2. *Alcaligenes faecalis***

*Alcaligenes faecalis* são bastonetes Gram-negativos flagelados, aeróbios, não fermentadores pertencentes à família das Alcaligenaceae. Essa espécie bacteriana é positiva à oxidase e é capaz de degradar a ureia e produzir amônia, aumentando o pH do ambiente (HASAN; NIZHU; RABBANI, 2019). Devido à sua capacidade de produzir uma reação alcalina em certos meios, foi assim denominada (TENA; FERNÁNDEZ; LAGO, 2015). Esse microrganismo saprófito é comumente encontrado no solo, na água, no meio ambiente, na microbiota intestinal humana e de animais domésticos; sendo considerada como emergente para enfermidades transmitidas através de alimentos (OLINDA et al., 2014). As bactérias desse gênero geralmente não são patogênicas, mas podem ocorrer infecções oportunistas ocasionais em humanos (BASHARAT et al., 2018).

A maioria das infecções causadas por *A. faecalis* são nasocomiais que ocorrem em pacientes imunocomprometidos. A contaminação por esse patógeno ocorre a partir de equipamentos úmidos hospitalares, como nebulizadores, respiradores e fluidos de lavagem (HASAN; NIZHU; RABBANI, 2019). A infecção sistêmica por esta espécie é muito incomum; entretanto, há relatos de casos que esse microrganismo causou meningite em recém-nascidos e bacteremia em pacientes com câncer (MORDI et al., 2013). Além disso, tem sido associado a abscesso pancreático, ulcera de córnea e casos esporádicos de endocardite, otite crônica, pielonefrite e peritonite (ALEBIOSU; ADETOYE; AYENI, 2017).

Atualmente, *A. faecalis* é amplamente utilizado no tratamento de esgotos, e várias cepas produzem um importante precursor, o ácido (R)-mandélico, essencial para a produção de diversos fármacos e, por isso, é também extensivamente empregado nas indústrias farmacêuticas (HASAN; NIZHU; RABBANI, 2019). Nas indústrias ambientais, algumas cepas são usadas para degradar muitos contaminantes orgânicos no processo de biodegradação de poluentes orgânicos e resíduos industriais perigosos (KONG; ZHU; ZHU, 2014). Além de tudo, estudos demonstram que essa espécie bacteriana produz nano-partículas com atividade nematicida, detergente, goma e bioplástico (BASHARAT et al., 2018).

### 1.5. LAGUNA DE TRAMANDAÍ

A Laguna de Tramandaí possui uma área de aproximadamente 18,8 km<sup>2</sup> e está localizada na planície costeira do Rio Grande do Sul - Brasil, entre as coordenadas 30°00'56" e 29°55'49" de latitude sul, e 50°06'21" e 56°11'20" de longitude oeste, onde situam-se as cidades balneárias de Tramandaí e Imbé (SILVEIRA, 2013). O canal da laguna recebe aportes de água salgada através de sua desembocadura, pois se encontra em conexão livre e permanente com o mar através de uma enseada. Além disso, o canal se comporta como escoadouro natural de drenagem do conjunto de lagos costeiro interligado tanto em direção norte como em direção sul (FARION, 2007). Devido à influência paralela do Rio Tramandaí e das águas doces que trazem as características das águas de toda sub-bacia norte, a salinidade das águas variam bastante, inclusive dentro de um mesmo dia, seja por efeito do vento, das chuvas ou mesmo das marés (CASTRO; DA ROCHA, 2016).

Outra característica da laguna é a baixa profundidade, com média de cerca de 1 a 1,4 metros nas zonas centrais, e máxima de 2,5 até 5 metros geralmente associada ao canal de comunicação com o mar. Ao sul contém praias arenosas, banhados em sua margem leste e

vegetação de restingas a sudoeste (TERCEIRO, 2017). A entrada de água salgada vinda do mar é capaz de alterar as condições do meio e definir a composição das comunidades animal e vegetal, suprimindo espécies menos tolerantes (SILVEIRA, 2013).

As oscilações populacionais sazonais são uma característica da região, pois atrai muitos turistas durante a alta temporada de veraneio, o qual pode representar um crescimento de até cinco vezes na população local. O turismo e a pesca são as atividades econômicas básicas da região. Os principais usos da água da Laguna Tramandaí são para a irrigação de lavouras de arroz, abastecimento público, diluição de esgotos doméstico e industrial, além de atividades recreacionais (LEITE, 2019).

## 1.6. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que o uso abundante de antibióticos em áreas clínicas e veterinárias vem contribuindo para o aparecimento de compostos ativos e bactérias resistentes em corpos hídricos receptores, é de suma importância identificar e caracterizar, quanto à susceptibilidade a antimicrobianos, microrganismos presentes em ambientes aquáticos. Além do mais, estudos demonstram que mesmo que esses efluentes passem pelas estações de tratamento de águas residuais, ainda há presença de resíduos de antimicrobianos e de bactérias resistentes nos corpos hídricos receptores superficiais e subterrâneos; sendo a capacidade de formação de biofilme e produção de fímbrias, mecanismos que podem promover a permanência dessas bactérias no ambiente aquático, facilitando a disseminação de genes de resistência a antibióticos. Esse trabalho apresenta relevância devido à caracterização de isolados bacterianos lactose negativos, provenientes da Laguna de Tramandaí - Rio Grande do Sul, quanto à sensibilidade a antimicrobianos e capacidade de aderência a superfícies.

## 1.7. OBJETIVOS

### 1.7.1. Objetivo geral

Verificar a presença de bactérias lactose negativas em ambiente aquático e caracterizá-las quanto à susceptibilidade a antimicrobianos e capacidade de aderência em superfície.

### 1.7.2 Objetivos específicos

1 - Isolar e identificar bactérias glicose positivas/lactose negativas e não *Pseudomonas spp.* de amostras da Laguna de Tramandaí, Rio Grande de Sul.

2 - Analisar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados bacterianos através do método de disco difusão em ágar e da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo.

3 - Caracterizar a capacidade de aderência à superfície dos isolados bacterianos por meio da quantificação de formação de biofilme pelo método do cristal violeta em microplaca e por testes utilizando mananoligossacarídeo comercial (MOS) para pesquisa de presença de fímbrias tipo I e III.

## 2. ARTIGO CIENTÍFICO

### Environmental Microbiology

#### CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LACTOSE NEGATIVAS AMBIENTAIS QUANTO À SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANAS E ADERÊNCIA À SUPERFÍCIE

Alexandra da Silva Nunes<sup>1</sup>, Belize Rodrigues Leite<sup>1</sup>, Gertrudes Corção<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brasil.

#### RESUMO

Os usos de antibióticos na medicina humana e na produção animal impuseram uma pressão seletiva sobre populações bacterianas em diversos ambientes contribuindo para a evolução e disseminação da resistência bacteriana. A maioria destes compostos passa inerte em sistemas de tratamento de efluentes e atingem corpos hídricos receptores, representando uma fonte de pressão seletiva no ecossistema que se inserem, contribuindo para permanência de cepas resistentes que ali estejam presentes. O presente estudo caracterizou bactérias Gram negativas, lactose negativas ambientais provenientes da Laguna de Tramandaí – RS quanto à susceptibilidade a antimicrobianos, por disco difusão em ágar e concentração inibitória mínima; além da capacidade de aderência à superfícies por formação de biofilme pelo método do cristal violeta e presença de fímbrias tipo I e III por aglutinação em lâmina com mananoligossacarídeo. Os resultados revelam a identificação de treze isolados de *Proteus mirabilis* resistentes à tetraciclina e doxiciclina, e três isolados de *Alcaligenes faecalis* resistentes à tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprim. Ambas as espécies produziram biofilme fortemente aderente. Nove isolados produziram fímbrias tipo I e dois fímbrias tipo III. A capacidade de produzir fímbrias e formar biofilme dos isolados resistentes facilita sua permanência no ambiente aquático, podendo atuar como reservatórios de genes de resistência a antibióticos.

Palavras chaves: Antimicrobianos. Resistência. Biofilme. Fímbrias.

## INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antibióticos nas áreas de medicina humana e produção animal tornou-se um sério problema de saúde global devido ao grande aumento de bactérias resistentes (WRIGHT, 2010). A resistência a antibióticos é responsável por centenas de milhares de mortes anualmente (BENGTSSON-PALME; KRISTIANSSON; LARSSON, 2018) e o seu aparecimento está associado à pressão seletiva imposta através do contato de microrganismos com baixas concentrações inibitórias de antimicrobianos distribuídos no ambiente aquático, como nos rios naturais, efluentes hospitalares, estações de tratamento de esgoto, portos e lagos (SERAFIM; RUIZ, 2018).

A maior parte desses compostos não são totalmente metabolizados nos organismos, passam inertes em sistemas tradicionais de tratamento de efluentes e podem atingir os corpos hídricos receptores superficiais e subterrâneos (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2015). Juntamente com esses compostos ativos, populações bacterianas potencialmente patogênicas a humanos e animais, além de bactérias comensais, que frequentemente abrigam genes de resistência a antibióticos (ARGs), podem estar presentes (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; KRAUPNER et al., 2018). Além disso, a introdução e o acúmulo progressivo no ambiente aquático de detergentes, desinfetantes, resíduos de poluição industrial, como metais pesados, também contribuem para a evolução e disseminação de microrganismos resistentes (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008).

Os mecanismos de resistência a antibióticos incluem produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico, alteração da permeabilidade da membrana que impede ou dificulta a penetração do antibiótico na célula, hiperexpressão de bombas de efluxo ao antibiótico ou alteração do sítio alvo do antibiótico (SEKI, 2012). A maior parte dos genes de resistência é encontrada em elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons. As bactérias podem atuar como doadores de novos elementos de resistência, transferindo – os entre diferentes espécies bacterianas por transferência horizontal (KHAN;

SÖDERQUIST; JASS, 2019). No ambiente aquático, a troca de genes de resistência é estimulada devido à fácil movimentação dos microrganismos e dos elementos genéticos móveis (PEIXOTO; GORDIANO; COSTA, 2012).

A Laguna de Tramandaí possui uma área de aproximadamente 18,8 km<sup>2</sup> e está localizada na planície costeira do Rio Grande do Sul - Brasil, onde se situam as cidades balneárias de Tramandaí e Imbé (SILVEIRA, 2013). O canal da laguna recebe aportes de água salgada, pois se encontra em conexão livre e permanente com o mar; além disso, o canal se comporta como escoadouro natural de drenagem do conjunto de lagos costeiro interligado tanto em direção norte como em direção sul (FARION, 2007). Ao sul possui praias arenosas, banhados em sua margem leste e vegetação de restingas a sudoeste (TERCEIRO, 2017). O turismo e a pesca são as atividades econômicas básicas da região. Os principais usos das águas da Laguna são para irrigação de lavouras de arroz, atividades recreacionais, abastecimento público e diluição de esgotos doméstico e industrial (LEITE, 2019).

O presente trabalho tem como objetivos isolar e identificar bactérias glicose positivas/lactose negativas e não *Pseudomonas spp.* presentes na Laguna de Tramandaí - Rio Grande do Sul – Brasil; analisar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos através da concentração inibitória mínima (MIC) e da técnica de disco difusão em ágar; caracterizar os isolados quanto à propriedade de aderência à superfície por meio da quantificação da formação de biofilme pelo método do cristal violeta em microplaca e por pesquisa da presença de fímbria tipo I ou tipo III através da aglutinação em lâmina com mananligossacarídeo comercial (MOS).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **ISOLADOS BACTERIANOS**

Alíquotas de 100 mL de amostras de quatro pontos distintos da Laguna de Tramandaí (Rio Grande do Sul - Brasil), coletadas na baixa e alta estação, foram concentradas por



filtração em membrana de nitrocelulose (0,45 µm de porosidade). O isolamento das bactérias foi feito através da deposição das membranas sobre Ágar Mac Conkey com posterior incubação a 37°C por 24 horas (Leite et al., 2019). De 392 isolados bacterianos, 16 foram caracterizados como glicose positivos/lactose negativos e não *Pseudomonas spp*, selecionados para o presente estudo e identificados através da técnica de MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight*) (MALDI Microflex Biotyper 4.0, Bruker).

#### DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS BACTERIANOS

A sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Alcaligenes faecalis* foi determinada através da concentração inibitória mínima (MIC) por microdiluição em caldo dos antimicrobianos Amicacina, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Doripenem, Florfenicol, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Sulfametazol/Trimetoprim e Tetraciclina, conforme CLSI 2018. Os isolados foram semeados em Ágar Triptona de Soja (TSA) e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, ajustados a escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) e diluídos 1:10 até uma suspensão final de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL em solução salina 0,9% estéril. Os antimicrobianos foram diluídos em série em caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado (CMHII) a partir da concentração 512 até 0,004 µg/mL. A cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle do teste.

A determinação da sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Proteus mirabilis* foi realizada através da técnica de disco difusão em ágar dos antimicrobianos Amicacina, Ampicilina, Amoxicilina-clavulanato, Ampicilina-sulbactam, Aztreonam, Cefepima, Cefotaxima, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Doxiciclina, Ertapenem, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Norfloxacina Piperacilina-tazobactam e Sulfametazol/Trimetoprim; e por meio da MIC dos antimicrobianos Doripenem, Doxiciclina, Ertapenem, Imipenem, Meropenem e Tetraciclina por microdiluição em caldo, conforme CLSI 2018. A cepa *Escherichia coli*

*ATCC 25922* foi utilizada como controle do teste. A interpretação dos halos de inibição e determinação da concentração inibitória mínima (MIC) foi realizada conforme CLSI 2018.

#### CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS QUANTO À CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Os 16 isolados bacterianos foram semeados em Ágar Tripton de Soja (TSA) e incubados a 37°C por 24 horas. A partir do TSA, os isolados foram ajustados à turbidez 0,5 da escala de McFarland em salina 0,9% estéril. Logo após, adicionou-se na placa de poliestireno de 96 poços de fundo plano 20 µL da suspensão do inóculo em octoplicata juntamente com 180 µL de Caldo Soja Trypticaseína (TSB), sendo a placa incubada a 37° por 24 horas. No controle positivo foram adicionados 20 µL da suspensão 0,5 da escala de McFarland do *Staphylococcus epidermidis ATCC 35984* e 180 µL de caldo TSB; no controle negativo adicionou-se 20 µL de salina não inoculada e 180 µL de caldo TSB; e no controle de esterilidade continha apenas 200 µL de caldo TSB.

Após 24 horas, os poços foram aspirados, lavados e levemente agitados três vezes com 200 µL de solução salina estéril. As células bacterianas que permaneceram aderidas na superfície (fundo e paredes do poço) da placa foram fixadas com 200 µL de metanol 99% (P.A) por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi esvaziada e deixada para secar para posterior coloração dos poços com 200 µL do corante cristal violeta a 2% por 5 minutos. O excesso do corante foi retirado com água destilada corrente e a placa deixada para secar. Logo após, as células coradas aderidas foram solubilizadas com 160 µL de etanol a 100% (P.A) por 30 minutos. Posteriormente, realizou-se a leitura da densidade óptica (OD) de cada poço em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.

Para interpretação dos resultados os isolados foram classificados em 4 categorias de acordo com os valores de OD dos biofilmes bacterianos. A OD ponto de corte (OD<sub>c</sub>) para o teste é definido como três desvios padrão acima da média da OD do controle negativo cujo

poço da placa conterá apenas o caldo TSB. A classificação foi interpretada da seguinte maneira:  $OD \leq OD_c$  não aderente;  $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$  fracamente aderente;  $2 \times OD_c < OD < 4 \leq OD_c$  moderadamente aderente;  $4 \times OD_c < OD$  fortemente aderente.

## CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS QUANTO À CAPACIDADE DE PRODUZIR FÍMBRIAS

A caracterização dos isolados quanto à capacidade de produzir fímbrias foi realizada através da aglutinação em lâmina utilizando mananoligossacarídeo comercial (MOS) para pesquisa da presença de fímbrias tipo I ou tipo III. Os isolados foram semeados em Ágar Triptona de Soja (TSA) e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foram cultivados e incubados a 37°C em Caldo Soja Tripticaseína (TSB) e após 4 horas de crescimento, em ágar fator de colonização (CFA) por 24 horas a 37°C. As colônias foram retiradas do ágar CFA e suspensas em solução salina 0,9% estéril na escala 0,5 de McFarland.

Para a pesquisa de fímbria tipo I ou tipo III foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana, 50 µL da solução de MOS a 0,3% em salina e 50 µL de salina não inoculada em uma placa de poliestireno de 96 poços de fundo redondo. Em outro poço, acrescentou-se 50 µL da suspensão bacteriana, 50 µL da solução MOS a 0,3% em salina e 50 µL de solução de D-manose a 3%. No controle positivo foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC 25922 e no controle negativo 100 µL de solução salina não inoculada com 50 µL de solução MOS a 0,3%. Após esse procedimento, a placa foi incubada a 4°C por 24 horas.

Os resultados foram lidos no microscópio óptico em aumento de 100 vezes, sendo 20 µL retirados de cada poço para observação em lâmina. A positividade para produção de fímbrias tipo I foi evidenciada pela formação de grumos no poço que continha apenas mananoligossacarídeo comercial (MOS) a 0,3%; sendo a fímbria tipo I manose-sensível, ela se ligará a D-manose presente no meio e não irá aglutinar com o MOS. Já a positividade para presença de fímbrias tipo III foi ressaltada pela presença de aglutinação em ambos os poços

testes; uma vez que esse tipo de fímbria é manose-resistente, a adição de D-manose ao poço teste, não irá interferir na aglutinação da fímbria com o MOS.

## RESULTADOS

Os 16 isolados analisados foram identificados como pertencentes às espécies *A. faecalis* (n=3) e *P. mirabilis* (n=13). Dentre os antimicrobianos testados para *A. faecalis*, todos apresentaram resistência à tetraciclina (MIC 32 µg/mL) e a sulfametoxazol/trimetoprim (MIC 8/152 µg/mL). Na técnica de disco difusão em ágar, os treze isolados de *Proteus mirabilis* mostraram-se resistentes apenas a doxiciclina. Os valores da concentração inibitória mínima (MIC) variam de 64 a 256 µg/mL para doxiciclina e de 16 a 32 µg/mL para tetraciclina, demonstrando resistência dos treze isolados de *P. mirabilis* a esses antimicrobianos.

Ambas as espécies bacterianas foram classificadas como produtoras de biofilmes fortemente aderentes. Dos dezesseis isolados analisados, nove apresentaram fímbrias tipo I e dois fímbrias tipo III. Cinco isolados não apresentaram nenhuma das fímbrias testadas. A espécie *P. mirabilis* apresentou mais isolados positivos para presença de fímbrias tipo I (Tabela 1). Todos os isolados que apresentaram fímbrias do tipo I ou tipo III foram resistentes aos antibióticos tetraciclina, doxiciclina e sulfametoxazol/trimetoprim; e formadores de biofilmes fortemente aderentes (Tabela 2).

**Tabela 1. Resultados dos testes utilizando mananoligossacarídeo comercial (MOS) para pesquisa da presença de fímbrias tipo I ou tipo III nos 16 isolados bacterianos.**

	Fímbria tipo I	Fímbria tipo III	Total
<i>A. faecalis</i> (n = 3)	1	1	2
<i>P. mirabilis</i> (n = 13)	8	1	9

**Tabela 2. Isolados bacterianos que apresentaram resistência a antimicrobianos, produção de fímbrias tipo I ou III e capacidade de formação de biofilme fortemente aderente.**

Isolado	Perfil de resistência	Concentração inibitória mínima* (ug/ml)	Produção de fímbria	Formação de biofilme
<i>A. faecalis</i> (P17)	TET – SXT	32 - 8/152	Tipo III	FORTE
<i>A. faecalis</i> (P63)	TET – SXT	16 - 8/152	Tipo I	FORTE
<i>P. mirabilis</i> (P24)	TET – DOX	16 – 64	Tipo I	FORTE
<i>P. mirabilis</i> (P26)	TET – DOX	16 – 128	Tipo I	FORTE
<i>P. mirabilis</i> (A29)	TET – DOX	16 – 64	Tipo III	FORTE
<i>P. mirabilis</i> (P44)	TET – DOX	32 – 256	Tipo I	FORTE
<i>P. mirabilis</i> (A65)	TET – DOX	32 – 128	Tipo I	FORTE
<i>P. mirabilis</i> (P81)	TET – DOX	16 – 64	Tipo I	FORTE
<i>P. mirabilis</i> (A85)	TET – DOX	16 – 64	Tipo I	FORTE
<i>P. mirabilis</i> (P96)	TET – DOX	16 – 64	Tipo I	FORTE
<i>P. mirabilis</i> (P105)	TET – DOX	16 – 64	Tipo I	FORTE

\*CIM para os antibióticos TET: Tetraciclina. DOX: Doxiciclina. SXT: Sulfametoxazol/Trimetoprim

## DISCUSSÃO

Há décadas, os antibióticos têm sido utilizados em tratamentos terapêuticos de doenças infecciosas em humanos e, como profiláticos e promotores de crescimento em animais; além de serem empregados na agricultura e aquicultura também (XU et al., 2015). O consumo de antibióticos vem aumentando em países industrializados e em desenvolvimento, resultando em detecção frequente desses compostos em ambientes aquáticos em todo mundo (ZHOU et al., 2011). Juntamente com esses compostos, bactérias patogênicas e potencialmente patogênicas a humanos e animais são liberadas constantemente com águas residuais em corpos hídricos receptores. Estes microrganismos podem abrigar genes de resistência a antibióticos inseridos em plasmídeos, transposons ou integrons, que podem ser transferidos entre comunidades bacterianas no ambiente aquático que são inseridos (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008).

Bactérias no ambiente aquático podem ser nativas do local, exógenas, transitórias ou ocasionalmente presentes na água como resultado de aporte de efluentes oriundos de animais, vegetais, do esgoto ou solo (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008). Através de

abordagens metagenômicas baseadas em sequenciamento de alto rendimento, um estudo demonstrou que a descargas de águas residuais da suinocultura pode resultar em patógenos bacterianos, como *Clostridium difficile* e *Arcobacter butzleri*, no seu rio receptor, induzindo mudança na comunidade bacteriana nesse ambiente aquático. (JIA et al., 2017). Outro estudo realizado na China demonstrou que fortes eventos de tempestades contribuem potencialmente com o aumento da frequência de bactérias resistentes a antibióticos do sistema de esgoto para lagos urbanos rasos (ZHANG et al., 2016).

A identificação dos isolados de *Proteus mirabilis* (n=13) e de *Alcaligenes faecalis* (n=3) na Laguna de Tramandaí pode indicar que a região esteja recebendo efluentes com poluição fecal, uma vez que *P. mirabilis* pertence à microflora intestinal de humanos e animais; e *A. faecalis* pode ser comumente encontrado no intestino também (DRZEWIECKA, 2016; OLINDA et al., 2014). Entretanto, mesmo que esses isolados sejam oriundos de outros locais, estão mantendo-se na Laguna. Devido ao baixo número de isolados recuperados, não foi possível fazer associações com os pontos ou período de coleta; todavia, os isolados foram recuperados de amostras de quatro pontos distintos, em anos diferentes, o que indica que são espécies disseminadas na Laguna. Estudos demonstram que animais marinhos e aquáticos podem absorver microrganismos da água (AL-BAHRY et al., 2012). Isolados de *P. mirabilis* foram identificados em associação com espojas marinha e ostras (FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2007; KEFALAS; CASTRITSI-CATHARIOS; MILIOU, 2003). Desse modo, o potencial de disseminação na cadeia alimentar aquática pode auxiliar a permanência destes microrganismos na Laguna de Tramandaí, RS.

A resistência dos isolados *P. mirabilis* e *A. faecalis* aos antibióticos tetraciclina (MIC 16 a 32 µg/mL) e doxiciclina (MIC 64 a 256 µg/mL); e tetraciclina (MIC 16 a 32 µg/mL) e sulfametazol/trimetopim (MIC 8/152µg/mL), respectivamente, determinada através da concentração inibitória mínima (MIC), corroboram com estudos realizados anteriormente. Em lagos urbanos da China detectou-se isolados de *P. mirabilis* que continham genes de

resistência à tetraciclina (ZHANG et al., 2016). *Alcaligenes sp.* possui um importante reservatório de genes de resistência a antibióticos e elementos genéticos móveis, tendo um grande potencial para disseminá-los (YANG et al., 2017). A identificação de bactérias resistentes no sistema de distribuição de água no sudoeste da Nigéria demonstrou que *Alcaligenes* era o único gênero bacteriano que apresentava mais de um gene de resistência à tetraciclina (ADESOJI et al., 2015). Em isolados de *A. faecalis* provenientes de esterco de animais, identificaram-se seis genes de resistência: *aadB*, *cat*, *bla<sub>OXA-10</sub>*, *aadA1*, *dfra1* e *aacA4*, indicando que eles eram resistentes a pelo menos quatro classes de antibióticos: aminoglicosídeos, cloranfenicol,  $\beta$ -lactâmicos e trimetoprim (YANG et al., 2017).

Através da quantificação de formação de biofilme e da pesquisa da presença de fímbrias tipo I ou tipo III caracterizou-se a capacidade de aderência em superfície dos isolados. Os dezesseis isolados foram classificados como formadores de biofilme fortemente aderente. A presença de fímbria tipo I foi evidenciada em nove isolados, sendo oito de *P. mirabilis*. Os resultados estão de acordo com estudos anteriores da literatura. *P. mirabilis* é um microrganismo conhecido devido a sua capacidade de produzir biofilme e expressar um número considerável de fímbrias (ARMBRUSTER et al., 2017). A espécie é o agente etiológico mais frequente em infecções do trato urinário associado ao cateter (CAUTI) devido à propriedade de adesão ao tecido epitelial do hospedeiro, que é obtida através de fímbrias tipo I e, posteriormente, formação de biofilme cristalino (GHAIMA; HAMID; HASSAN, 2017; WILKS; FADER; KEEVIL, 2015).

Trabalhos sobre a identificação de bactérias resistentes formadoras de biofilme em ambientes aquáticos já foram realizados. Em uma estação de tratamento de águas residuais na Alemanha analisou-se cepas bacterianas e constatou-se que cerca de 20-40% (n = 30) eram resistentes a quatorze antibióticos, sendo a maioria capaz de formar biofilme (JAŁOWIECKI et al., 2018). Cinquenta isolados de *P. aeruginosa*, provenientes de águas residuais do Burn Center em Gilão – Irã mostraram-se resistentes à gentamicina, imipenem, tobramicina e

piperacilina, sendo que, 70% desses, expressavam o gene *pslA* com uma frequência de 42,9% e eram formadores de biofilme (EMAMI et al., 2015). Uma análise realizada em biofilmes de águas residuais, superficiais e de água potável na cidade de Mainz, identificou *Enterococos spp.* resistentes à vancomicina e Enterobacteriaceae hidrolisantes de  $\beta$ -lactâmicos predominantemente em biofilmes de águas residuais; além dos genes *vanA*, *mecA* e *ampC*, que conferem resistência aos antimicrobianos vancomicina e aos  $\beta$ -lactâmicos, (SCHWARTZ et al., 2003). Em uma bacia hidrográfica agrícola localizada na Colúmbia Britânica foi demonstrado que os biofilmes de sedimentos e rochas dos rios eram os mais propensos a estarem associados a isolados de *E.coli* resistência à tetraciclina, ampicilina, estreptomicina e ácido nalidíxico; sendo a maior frequência de resistência observada no local de maior impacto agrícola (MAAL-BARED et al., 2013).

A capacidade de produzir biofilme fortemente aderente e fímbrias tipo I ou tipo III dos isolados resistentes de *P. mirabilis* e *A. faecalis* facilita a permanência destas espécies no ambiente aquático, uma vez que as fímbrias auxiliam na adesão da célula bacteriana a uma determinada superfície e o crescimento bacteriano em forma de biofilme confere proteção e estabilidade às mudanças que podem ocorrer no ambiente. Dessa forma, esses microrganismos podem atuar como reservatórios de genes de resistência a antibióticos na Laguna de Tramandaí, Rio Grande do Sul – Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.
- ADESOGI, A. T. et al. Prevalence of tetracycline resistance genes among multi-drug resistant bacteria from selected water distribution systems in southwestern Nigeria. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12941-015-0093-1>>



- AL-BAHRY, S. N. et al. Biomonitoring marine habitats in reference to antibiotic resistant bacteria and ampicillin resistance determinants from oviductal fluid of the nesting green sea turtle, *Chelonia mydas*. **Chemosphere**, [s. l.], v. 87, n. 11, p. 1308–1315, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653512001439>>
- ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 1565–1574, 2014.
- ALEBIOSU, K. M.; ADETOYE, A.; AYENI, F. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria against *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia vermicola*, *Alcaligenes faecalis* and methicillin resistant *S. aureus*. **West African Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 132–142, 2017.
- ALLEN, H. K; DONATO, J; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, H; DAVIES, J; HANDEKSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature reviews Microbiology** **8**, p. 251–259, 2010.
- APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and disease. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.
- ARMBRUSTER, C. E. et al. The pathogenic potential of *Proteus mirabilis* is enhanced by other uropathogens during polymicrobial urinary tract infection. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 1–23, 2017.
- SERAFIM, V. J; RUIZ, L.G.P. Genes bacterianos de resistência no meio ambiente. **Revistas Unilago**, v. 1, n. 1, 2018.
- BANERJEE, G.; RAY, A. K.; KUMAR, R. Effect of temperature on lateral gene transfer efficiency of multi-antibiotics resistant bacterium, *alcaligenes faecalis*. **Sains Malaysiana**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 909–914, 2016.
- BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 260–265, 2008.
- BASHARAT, Z. et al. Genome sequencing and analysis of *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* MB207. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-21919-4>>
- BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSOON, E.; LARSSON, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 68–80, 2018.
- BERGLUND, B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infection Ecology & Epidemiology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 28564, 2015.
- BOUDJEMAA, H. et al. Molecular drivers of emerging multidrug resistance in *Proteus mirabilis* clinical isolates from Algeria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 18, p. 249–256, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.030>>
- BRAVO, V. et al. Distinct mutations led to inactivation of type 1 fimbriae expression in *Shigella* spp. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–17, 2015.
- CAIXETA, D. S. et al. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas

espécies de pseudomonas em superfície de aço inoxidável. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 142–150, 2012.

CALISTO, F. A.G. **Emergência de Carbapeneamases em Klebsiella Pneumoniae: O desafio das bactérias**. 2011. f. 53. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2011.

CAPASSO, C.; SUPURAN, C. T. Sulfa and trimethoprim-like drugs-antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 379–387, 2014.

CASTANHEIRA, B. A. M. G. Mecanismos de resistência a antibióticos. **Dissertação de Mestrado, Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde**, [s. l.], p. 42, 2013.

COLEMAN, J. P.; SMITH, C. J. Structure and Composition of Microbes. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, [s. l.], p. 1–7, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552323602247>>

CONLY, J. M.; JOHNSTON, B. L. Macrolide resistance in Streptococcus pneumoniae: Fallacy or fact? **Canadian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 13–16, 2002.

CORREIA, S; POETA, P; HÉBRAUD, M; CAPELO, J. M; IGREJAS, G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 5, p. 551–559, 2017.

CUNHA, R. C. et al. Staphylococcal slime layers and biofilm from different origins. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 49, n. 5, 2019.

DA SILVA FILHO, L. V. R. F.; PINTO, L. A.; STEIN, R. T. Use of macrolides in lung diseases: recent literature controversies. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. S52–S60, 2015.

DA SILVA TRENTIN, D.; BRANDT GIORDANI, R.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate1. **Revista Liberato**, [s. l.], v. 14, n. 22, p. 213–236, 2013.

DINOS, G. P. The macrolide antibiotic renaissance. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 174, n. 18, p. 2967–2983, 2017.

DRZEWIECKA, D. et al. Structure and serological properties of the O-antigen of two clinical Proteus mirabilis strains classified into a new Proteus O77 serogroup. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 185–194, 2008.

DRZEWIECKA, D. Significance and Roles of Proteus spp. Bacteria in Natural Environments. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 741–758, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>>

RABIM, N; ZHENG, Y; OPOKU-TEMENG, C; DU, Y; BONSU, R; SINTIM. H.O. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 7, p. 493–512, 2015.

EMAMI, S. et al. Antibiotic resistance pattern and distribution of psla gene among biofilm producing pseudomonas aeruginosa isolated from waste water of a burn center. **Jundishapur Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 11, 2015.

FACCO, C. **Presença de *Escherichia coli* em infecções do trato urinário e seu perfil de resistência aos antimicrobianos.** 2015. f. 41. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA, Ariquemes – RO, 2015.

FERNÁNDEZ-DELGADO, M. et al. Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of Venezuelan oysters. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 355–359, 2007.

FLANNERY, E. L.; ANTCZAK, S. M.; MOBLEY, H. L. T. Self-transmissibility of the integrative and conjugative element ICEPm1 between clinical isolates requires a functional integrase, relaxase, and type IV secretion system. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 193, n. 16, p. 4104–4112, 2011.

FOLLOWING, R.; THERAPY, H. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

GHAIMA, K. K.; HAMID, H. H.; HASSAN, S. F. Biofilm formation , Antibiotic resistance and Detection of mannose-resistant *Proteus*-like ( MR / P ) fimbriae genes in *Proteus mirabilis* isolated from UTI . **International Journal of ChemTech Research**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 964–971, 2017.

GIRLICH, D.; BONNIN, R. A.; BOGAERTS, P. Chromosomal Amplification of the blaOXA-58 Carbapenemase Gene in a *Proteus mirabilis* Clinical Isolate. **American Society for Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 1–10, 2017.

VUONG, H. E; YANO, J. M; FUNG, T. C; HSIAO, E. Y. The Microbiome and Host Behavior. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 5, p. 139–148, 2017.

GROSSMAN, T. H. Tetracycline antibiotics and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 4, 2016.

HALL, C. W.; MAH, T. F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 276–301, 2017.

HASAN, M. J.; NIZHU, L. N.; RABBANI, R. Bloodstream infection with pandrug-resistant *Alcaligenes faecalis* treated with double-dose of tigecycline. **IDCases**, [s. l.], v. 18, p. e00600, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00600>>

HOA, P. T. P. et al. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 409, n. 15, p. 2894–2901, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.030>>

JALOWIECKI, Ł. et al. Properties of Antibiotic-Resistant Bacteria Isolated from Onsite Wastewater Treatment Plant in Relation to Biofilm Formation. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 639–649, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00284-017-1428-2>>

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>>

JIA, S. et al. Fate of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community in livestock breeding wastewater and its receiving river water. **Water Research**,

[s. l.], v. 124, p. 259–268, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.061>>

KAUFMAN, G. Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. **Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)**, [s. l.], v. 25, n. 42, p. 49–55, 2011.

KEFALAS, E.; CASTRITSI-CATHARIOS, J.; MILIOU, H. Bacteria associated with the sponge *Spongia officinalis* as indicators of contamination. **Ecological Indicators**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 339–343, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1470160X03000025>>

OLIVEIRA, D. K; CARDOSO, A. M. Biofilmes Microbianos: Um Desafio Para a Saúde. **NewsLab** [s. l.], 2018. Disponível em: <<https://newslab.com.br/biofilmes-microbianos-um-desafio-para-a-saude/>>

KHAN, F. A.; SÖDERQUIST, B.; JASS, J. Prevalence and diversity of antibiotic resistance genes in Swedish aquatic environments impacted by household and hospital wastewater. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. APR, p. 1–12, 2019.

KRAUPNER, N. et al. Selective concentration for ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* grown in complex aquatic bacterial biofilms. **Environment International**, [s. l.], v. 116, n. January, p. 255–268, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.029>>

KRAUSE, K. M; SERIO, A. W; KANE, T. R; CONNOLLY, L. E. Aminoglycosides : An Overview. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, [s. l.], 2016.

LEE, Y. M. et al. Succession of bacterial community structure during the early stage of biofilm development in the Antarctic marine environment. **Korean Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 49–58, 2016.

MAAL-BARED, R. et al. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 443, p. 315–323, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.106>>

MARKLEY, J. L.; WENCEWICZ, T. A. Tetracycline-inactivating enzymes. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–22, 2018.

MONTEZZI, L. F. et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 174–177, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.10.016>>

MORDI, R. M. et al. THE PREVALENCE OF *ALCALIGENES FAECALIS* IN BACTEREMIA, MENINGITIS AND WOUND SEPSIS IN A TERTIARY HEALTH CARE INSTITUTIONS IN WESTERN PART OF NIGERIA. **The International Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 123–129, 2013. Disponível em: <<http://www.pakinsight.com/journals/IJB.htm>>

MUNHOZ, D. D. **Expressão e produção da fímbria ECP por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2015. 34 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MURPHY, C. N. **The role of cyclic di-GMP in regulating type 3 fimbriae : a colonization factor of *Klebsiella pneumonia***. 2014. 134 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) -

Faculdade de Iowa, Iowa, 2014.

NZAKIZWANAYO, J. et al. Bacteriophage can prevent encrustation and blockage of urinary catheters by *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 1530–1536, 2016.

OLINDA, R. G. et al. Isolamento de *Alcaligenes faecalis* em peixe *Betta splendens* Regan, 1910 no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 360–362, 2014.

PARTRIDGE, S. R. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. **Pathology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 276–284, 2015.

PEIXOTO, L. J. S.; SÁ, M. C. A.; GORDIANO, L. A.; COSTA, M. M. *Aeromonas spp.*: Fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arq. Inst. Biol**, [s. l.], n. 3, p. 453–461, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v79n3/a20v79n3.pdf>>

PERES, B. M. **Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de sistema de tratamento de água, sistemas contaminados e esgoto**. 2011. 25 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Sticky Situations : Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. **ASM Journals**, [s. l.], p. 2413–2425, 2012.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 30, p. 67–78, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527416000060>>

RODRIGUEZ-MOZAZ, S. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, [s. l.], v. 69, p. 234–242, 2015.

SCAVONE, P. et al. Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 1–9, 2016.

SCHROLL, C. et al. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2010.

SCHWARTZ, T. et al. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 325–335, 2003.

SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 90–101, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>>

STAHLHUT, S. G. et al. Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 195, n. 24, p. 5602–5613, 2013.

TENA, D.; FERNÁNDEZ, C.; LAGO, M. R. *Alcaligenes faecalis*: An unusual cause of skin and soft tissue infection. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 128–130, 2015.

TERCEIRO, A. M. Conhecendo a Pesca Artesanal Em Tramandaí E Imbé – Rs: Distribuição

Espacial E Desafios. **Ciência e Natura**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 341, 2017.

TIMILEHIN, A. A.; OLATOYE, O.; OGUNJOBI, A. A. Genotypic Characterization of Aminoglycoside Resistance Genes from Bacteria Isolates in Selected Municipal Drinking Water Distribution Sources in Southwestern Nigeria. **Ethiopian Journal of Health Sciences**, [s. l.], n. June, 2019.

TOYOFUKU, M. et al. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 7–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>>

CAG, Y; CASKURLU, H; FAN , Y; CAO, B; VAHABOGLU, H. Resistance mechanisms. **Annals of Translational Medicine**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

WILKS, S. A.; FADER, M. J.; KEEVIL, C. W. Novel insights into the proteus mirabilis crystalline biofilm using real-time imaging. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1–13, 2015.

WRIGHT, G. D. Q & A : Antibiotic resistance : where does it come from and what can we do about it ?. **BMC Biology**, 2010.

XU, J. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. **Chemosphere**, [s. l.], v. 119, p. 1379–1385, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>>

YANG, Q. et al. Molecular characterization of antibiotic resistance in cultivable multidrug-resistant bacteria from livestock manure. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 229, p. 188–198, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.073>>

ZANGO, U. U; IBRAHIM, M; SHAWAI, S. A. A; SHAMSUDDIN, I. M. A review on  $\beta$  - lactam antibiotic drug resistance. **MedCrave**, [s. l.], n. June, 2019.

ZHANG, S. et al. Antibiotic concentration and antibiotic-resistant bacteria in two shallow urban lakes after stormwater event. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 9984–9992, 2016.

ZHOU, L.-J. et al. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 159, n. 7, p. 1877–1885, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749111001904>>

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados revelam que a Laguna de Tramandaí - RS possui uma população pouca diversificada em relação a bastonetes Gram-negativos não fermentadores de lactose e que os mesmos apresentam uma baixa resistência aos antimicrobianos testados.

Contudo, onze isolados bacterianos foram resistentes aos antibióticos doxiciclina, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina; formadores de biofilme fortemente aderente e produtores de fímbrias tipo I ou tipo III.

A capacidade de formar biofilme e produzir fímbrias dos isolados resistentes facilita a permanência no ambiente aquático e, assim, esses microrganismos podem atuar como reservatórios de genes de resistência a antibióticos.

Tendo em vista que a resistência aos antibióticos está gradualmente aumentando, os resultados deste trabalho são significativos, pois demonstram que o ambiente aquático é um veículo de disseminação de genes de resistência a antibióticos. Além disso, a detecção de bactérias resistentes presentes em ambientes aquáticos poderá refletir parte da origem dos mecanismos de resistência que é observada na área clínica atualmente.

## REFERÊNCIAS

AAWC (Association for the Advancement of Wound Care). Advancing your practice: Understanding Wound Infection and the Role of Biofilms. Malvern: AAWC. 2008.

ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.

ADESOSJI, A. T. et al. Prevalence of tetracycline resistance genes among multi-drug resistant bacteria from selected water distribution systems in southwestern Nigeria. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12941-015-0093-1>>

AL-BAHRY, S. N. et al. Biomonitoring marine habitats in reference to antibiotic resistant bacteria and ampicillin resistance determinants from oviductal fluid of the nesting green sea turtle, *Chelonia mydas*. **Chemosphere**, [s. l.], v. 87, n. 11, p. 1308–1315, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653512001439>>

ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 1565–1574, 2014.

ALEBIOSU, K. M.; ADETOYE, A.; AYENI, F. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria against *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia vermicola*, *Alcaligenes faecalis* and methicillin resistant *S. aureus*. **West African Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 132–142, 2017.

ALLEN, H. K; DONATO, J; WANG, H. H; CLOUD-HANSEN, K. A; DAVIES, J; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], n. May 2014, 2010.

APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and disease. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.



ARMBRUSTER, C. E. et al. The pathogenic potential of *Proteus mirabilis* is enhanced by other uropathogens during polymicrobial urinary tract infection. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 1–23, 2017.

SERAFIM, V. J; RUIZ, L.G.P. Genes bacterianos de resistência no meio ambiente. **Revistas Unilago**, v. 1, n. 1, 2018.

BANERJEE, G.; RAY, A. K.; KUMAR, R. Effect of temperature on lateral gene transfer efficiency of multi-antibiotics resistant bacterium, *Alcaligenes faecalis*. **Sains Malaysiana**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 909–914, 2016.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 260–265, 2008.

BASHARAT, Z. et al. Genome sequencing and analysis of *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* MB207. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-21919-4>>

BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSOON, E.; LARSSON, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 68–80, 2018.

BERGLUND, B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infection Ecology & Epidemiology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 28564, 2015.

BOUDJEMAA, H. et al. Molecular drivers of emerging multidrug resistance in *Proteus mirabilis* clinical isolates from Algeria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 18, p. 249–256, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.030>>

BRAVO, V; PUHAR, A; SANSONETTI, P; PARSOT, C; TORO, C. S. Distinct mutations led to inactivation of type 1 fimbriae expression in *Shigella* spp. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–17, 2015.

CAIXETA, D. S. et al. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas

espécies de pseudomonas em superfície de aço inoxidável. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 142–150, 2012.

CALISTO, F. A.G. **Emergência de Carbapeneamases em Klebsiella Pneumoniae: O desafio das bactérias**. 2011. f. 53. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2011.

CAPASSO, C.; SUPURAN, C. T. Sulfa and trimethoprim-like drugs-antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 379–387, 2014.

CASTANHEIRA, B. A. M. G. Mecanismos de resistência a antibióticos. **Dissertação de Mestrado, Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde**, [s. l.], p. 42, 2013.

COLEMAN, J. P.; SMITH, C. J. Structure and Composition of Microbes. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, [s. l.], p. 1–7, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552323602247>>

CONLY, J. M.; JOHNSTON, B. L. Macrolide resistance in Streptococcus pneumoniae: Fallacy or fact? **Canadian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 13–16, 2002.

CORREIA, S; POETA, P; HÉBRAUD, M; CAPELO, J. M; IGREJAS, G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 5, p. 551–559, 2017.

CUNHA, R. C; ROSA, M. D. H; SILVA, C; SANTOS, F. D. S; LEITE, F. P. L. Staphylococcal slime layers and biofilm from different origins. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 49, n. 5, 2019.

DA SILVA FILHO, L. V. R. F.; PINTO, L. A.; STEIN, R. T. Use of macrolides in lung diseases: recent literature controversies. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. S52–S60, 2015.

DA SILVA TRENTIN, D.; BRANDT GIORDANI, R.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate1.

**Revista Liberato**, [s. l.], v. 14, n. 22, p. 213–236, 2013.

DINOS, G. P. The macrolide antibiotic renaissance. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 174, n. 18, p. 2967–2983, 2017.

DRZEWIECKA, D. et al. Structure and serological properties of the O-antigen of two clinical *Proteus mirabilis* strains classified into a new *Proteus* O77 serogroup. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 185–194, 2008.

DRZEWIECKA, D. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 741–758, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>>

RABIM, N; ZHENG, Y; OPOKU-TEMENG, C; DU, Y; BONSU, R; SINTIM. H.O. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 7, p. 493–512, 2015.

EMAMI, S. et al. Antibiotic resistance pattern and distribution of *psla* gene among biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from waste water of a burn center. **Jundishapur Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 11, 2015.

FACCO, C. **Presença de *Escherichia coli* em infecções do trato urinário e seu perfil de resistência aos antimicrobianos**. 2015. f. 41. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA, Ariquemes – RO, 2015.

FERNÁNDEZ-DELGADO, M. et al. Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of Venezuelan oysters. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 355–359, 2007.

FLANNERY, E. L.; ANTCZAK, S. M.; MOBLEY, H. L. T. Self-transmissibility of the integrative and conjugative element ICEPm1 between clinical isolates requires a functional integrase, relaxase, and type IV secretion system. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 193, n. 16, p. 4104–4112, 2011.

FOLLOWING, R.; THERAPY, H. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

GHAIMA, K. K.; HAMID, H. H.; HASSAN, S. F. Biofilm formation , Antibiotic resistance and Detection of mannose-resistant Proteus-like ( MR / P ) fimbriae genes in *Proteus mirabilis* isolated from UTI . **International Journal of ChemTech Research**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 964–971, 2017.

GIRLICH, D.; BONNIN, R. A.; BOGAERTS, P. Chromosomal Amplification of the blaOXA-58 Carbapenemase Gene in a *Proteus mirabilis* Clinical Isolate. **American Society for Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 1–10, 2017.

HOPPER, D. C; JACOBY, G. A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 5, p. 139–148, 2015.

GROSSMAN, T. H. Tetracycline antibiotics and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 4, 2016.

HALL, C. W.; MAH, T. F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 276–301, 2017.

HASAN, M. J.; NIZHU, L. N.; RABBANI, R. Bloodstream infection with pandrug-resistant *Alcaligenes faecalis* treated with double-dose of tigecycline. **IDCases**, [s. l.], v. 18, p. e00600, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00600>>

HOA, P. T. P. et al. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 409, n. 15, p. 2894–2901, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.030>>

JALOWIECKI, Ł. et al. Properties of Antibiotic-Resistant Bacteria Isolated from Onsite Wastewater Treatment Plant in Relation to Biofilm Formation. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 639–649, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00284-017-1428-2>>

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>>

JIA, S. et al. Fate of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community in livestock breeding wastewater and its receiving river water. **Water Research**, [s. l.], v. 124, p. 259–268, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.061>>

KAUFMAN, G. Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. **Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)**, [s. l.], v. 25, n. 42, p. 49–55, 2011.

KEFALAS, E.; CASTRITSI-CATHARIOS, J.; MILIOU, H. Bacteria associated with the sponge *Spongia officinalis* as indicators of contamination. **Ecological Indicators**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 339–343, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1470160X03000025>>

OLIVEIRA, D. K; CARDOSO, A. M. Biofilmes Microbianos: Um Desafio Para a Saúde. **NewsLab** [s. l.], 2018. Disponível em: <<https://newslab.com.br/biofilmes-microbianos-um-desafio-para-a-saude/>>

KHAN, F. A.; SÖDERQUIST, B.; JASS, J. Prevalence and diversity of antibiotic resistance genes in Swedish aquatic environments impacted by household and hospital wastewater. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. APR, p. 1–12, 2019.

KRAUPNER, N. et al. Selective concentration for ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* grown in complex aquatic bacterial biofilms. **Environment International**, [s. l.], v. 116, n. January, p. 255–268, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.029>>

KRAUSE, K. M; SERIO, A. W; KANE, T. R; CONNOLLY, L. E. Aminoglycosides : An Overview. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, [s. l.], 2016.

LEE, Y. M. et al. Succession of bacterial community structure during the early stage of biofilm development in the Antarctic marine environment. **Korean Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 49–58, 2016.

MAAL-BARED, R. et al. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 443, p. 315–323, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.106>>

MARKLEY, J. L.; WENCEWICZ, T. A. Tetracycline-inactivating enzymes. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–22, 2018.

MONTEZZI, L. F. et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 174–177, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.10.016>>

MORDI, R. M. et al. THE PREVALENCE OF ALCALIGENES FAECALIS IN BACTEREMIA, MENINGITIS AND WOUND SEPSIS IN A TERTIARY HEALTH CARE INSTITUTIONS IN WESTERN PART OF NIGERIA The International Journal of Biotechnology. **The International Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 123–129, 2013. Disponível em: <<http://www.pakinsight.com/journals/IJB.htm>>

MUNHOZ, D. D. **Expressão e produção da fímbria ECP por Escherichia coli enteropatogênica atípica**. 2015. 34 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MURPHY, C. N. **The role of cyclic di-GMP in regulating type 3 fimbriae : a colonization factor of Klebsiella pneumonia**. 2014. 134 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Iowa, Iowa, 2014.

NZAKIZWANAYO, J. et al. Bacteriophage can prevent encrustation and blockage of urinary catheters by Proteus mirabilis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 1530–1536, 2016.

OLINDA, R. G. et al. Isolamento de Alcaligenes faecalis em peixe Betta splendens Regan, 1910 no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 360–362, 2014.

PARTRIDGE, S. R. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. **Pathology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 276–284, 2015.

PERES, B. M. **Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de sistema de tratamento de água, sistemas contaminados e esgoto**. 2011. 25 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Sticky Situations : Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. **ASM Journals**, [s. l.], p. 2413–2425, 2012.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 30, p. 67–78, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527416000060>>

RODRIGUEZ-MOZAZ, S. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, [s. l.], v. 69, p. 234–242, 2015.

SCAVONE, P. et al. Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 1–9, 2016.

SCHROLL, C. et al. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2010.

SCHWARTZ, T. et al. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 325–335, 2003.

SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 90–101, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>>

STAHLHUT, S. G. et al. Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 195, n. 24, p. 5602–5613, 2013.

TENA, D.; FERNÁNDEZ, C.; LAGO, M. R. *Alcaligenes faecalis*: An unusual cause of skin and soft tissue infection. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 128–130, 2015.

TERCEIRO, A. M. Conhecendo a Pesca Artesanal Em Tramandaí E Imbé – Rs: Distribuição Espacial E Desafios. **Ciência e Natura**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 341, 2017.

TIMILEHIN, A. A.; OLATOYE, O.; OGUNJOBI, A. A. Genotypic Characterization of Aminoglycoside Resistance Genes from Bacteria Isolates in Selected Municipal Drinking Water Distribution Sources in Southwestern Nigeria. **Ethiopian Journal of Health Sciences**, [s. l.], n. June, 2019.

TOYOFUKU, M. et al. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 7–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>>

VUONG, H. E; YANO, J. M; FUNG, T. C; HSIAO, E. Y. The Microbiome and Host Behavior. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 5, p. 139–148, 2017.

WILKS, S. A.; FADER, M. J.; KEEVIL, C. W. Novel insights into the proteus mirabilis crystalline biofilm using real-time imaging. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1–13, 2015.

WRIGHT, G. D. Q & A : Antibiotic resistance : where does it come from and what can we do about it ?. **BMC Biology**, 2010.

XU, J. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. **Chemosphere**, [s. l.], v. 119, p. 1379–1385, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>>

YANG, Q. et al. Molecular characterization of antibiotic resistance in cultivable multidrug-resistant bacteria from livestock manure. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 229, p. 188–198, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.073>>

ZANGO, U. U; IBRAHIM, M; SHAWAI, S. A. A; SHAMSUDDIN, I. M. A review on  $\beta$ -lactam antibiotic drug resistance. **MedCrave**, [s. l.], n. June, 2019.

ZHANG, S. et al. Antibiotic concentration and antibiotic-resistant bacteria in two shallow urban lakes after stormwater event. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 9984–9992, 2016.

ZHOU, L.-J. et al. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 159, n. 7, p. 1877–1885, 2011.



## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO REVISTA “ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY”




---

[HOME](#)

[ABOUT](#) ▾

[CONTRIBUTE](#) ▾

[BROWSE](#) ▾

---

### Author Guidelines

*Environmental Microbiology (EMI)* and *Environmental Microbiology Reports (EMIR)* publish articles reporting original experimental or theoretical work that substantively advances our understanding of the lives and activities of microorganisms in the environment, microbial communities, microbial interactions and microbially driven environmental processes. A key acceptance criterion for publication in the Journals is that the originality and significance of the work places it in the upper 10 % of research in the field.

*EMI*, which is published monthly, and *EMIR*, which is published bimonthly, share the same:

#### Scope

The scope of *EMI* and *EMIR* includes, but is not restricted to:

- microbial communities: structure: function relationships and communal behavior
- microbial interactions and interactions with plants, animals and abiotic factors, including systems analysis of interactions and their component networks
- pathogen ecology and environmental epidemiology
- genomics, functional genomics, environmental genomics/metagenomics, bioinformatic analyses and comparative genomics
- responses to environmental signals and stress factors
- primary and secondary production
- element cycles and biogeochemical processes
- microbial physiological, metabolic and structural diversity
- extremophiles and life in extreme and unusual little-explored habitats
- pollution microbiology
- microbially-influenced global changes
- growth and survival
- microbes and surfaces, adhesion, biofilm biology, biofouling
- population biology and clonal structure
- microbial community genetics and evolutionary processes
- modelling and theory development
- new technological developments in microbial ecology, in particular for the study of activities of microbial communities and of non-culturable microorganisms

Interdisciplinary studies of fundamental problems are particularly appropriate.

## Article Types

The types of article published in both Journals reflect the Editors' endeavour to actively promote the field of environmental microbiology, the broad scope of the subject, and the impact of socio-political, health, nutritional and economic issues and developments. Thus, in addition to the principal content of full-length (*EMI*) and compact (*EMIR*) research papers, issues may include Editorials/Opinions, Minireviews, Web Alerts, and Correspondence (general, scientific). The importance of genomics to the field is recognized by the Genomics Update feature.

### *Research Papers and Brief Reports*

These report new original findings that significantly advance the field of environmental microbiology/microbial ecology. A principal criterion for judging the potential acceptability of a paper is that the advance reported places it in the top 10 % of research in the field. Papers may either be Full Papers or Brief Reports. In both cases, the work must be complete (preliminary communications will not be considered) and represent the indicated level of originality and accomplishment. Research papers documenting major studies should be submitted to *EMI*; Brief Reports reporting significant research in compact form should be submitted to *EMIR*. In all cases, manuscripts should be as concise as permitted by good scientific reporting. Essential material (e.g. primer sequences; strain lists, etc.) not crucial to an understanding of the main findings should be submitted as Supplementary Information.

The ultimate decision of whether a submission may be published as a Research Article or Brief Report is not dictated by the length of the initial submission, but rather by the length considered by the reviewers and Editor to be appropriate for the significance of the advance described and for its proper scientific documentation.

### *Minireviews*

These bring to the attention of our readership exciting new developments and/or concepts in a timely fashion. They are selective in scope, focused and concise, rather than being comprehensive or historical, and may be somewhat speculative, if this is likely to provoke interesting discussions and stimulate new lines of creative experimentation. There is no strict format for minireviews, but they should include a Summary, Introduction, and Concluding Remarks, which bracket the main text. Literature citations should be balanced but not exhaustive. Most, but not all, minireviews are invited; authors wishing to submit a minireview should first contact the Minireview Editor, Juan Luis Ramos, to ascertain whether or not their topic is appropriate.

### *Correspondence*

Submissions should contribute to discussions of topical issues in or impacting environmental microbiology, advance new hypotheses or provide new interpretations of existing hypotheses.

## Preprints

*Environmental Microbiology* will consider for review articles previously available as preprints on non-commercial servers such as ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv, etc. Authors may also post the submitted version of their manuscript to non-commercial servers at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

### Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

### Presentation of manuscripts

Authors should ensure that manuscripts submitted online have line numbers.

#### *Lengths of printed articles*

Papers should be focused and succinct, and as concise as possible consistent with clarity and good scientific reporting practice. Material essential for the paper, but not for an understanding of the advance reported, such as lists of primer sequences, strain characteristics, or material too large to be part of the main text (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies, or any other material for which insufficient space in the journals is available) etc., must be submitted as Supporting Information, for publication online. The lengths of printed articles will generally not exceed the following: Research Articles: 10 printed pages (approx. 20 double line-spaced manuscript pages with 5 displays); Brief Reports: 5 printed pages; Minireviews: 6 printed pages; Correspondence: 2 printed pages. However, longer manuscripts will be considered if the extra length is dictated by good scientific reporting practice.

#### *Supporting information*

Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>.

### Exclusivity, copyright and author ethical obligations

Papers must be submitted exclusively to *EMI* or *EMIR* and are accepted on the understanding that they are entirely original and have not been, and will not be, published elsewhere. If accepted, authors will retain copyright of the article, and grant the Publisher the exclusive right to publish.

In submitting a manuscript to *EMI/EMIR*, the corresponding author must explicitly state in a cover letter that the content and authorship of the submitted manuscript has been approved by all authors, and that all prevailing local, national and international regulations and conventions, and normal scientific ethical practices, have been respected. Authors are reminded of the need to avoid plagiarism, and are strongly advised to employ one of the available plagiarism detection softwares. Failure to respect ethical norms may result in imposition of sanctions.

### Conflict of Interest

*EMI* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Editor, in the manuscript (under the Acknowledgment section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

### **Pre-submission English-language editing**

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

### **Presentation of manuscripts**

Authors should ensure that manuscripts submitted online have line numbers.

#### *Lengths of printed articles*

Papers should be focused and succinct, and as concise as possible consistent with clarity and good scientific reporting practice. Material essential for the paper, but not for an understanding of the advance reported, such as lists of primer sequences, strain characteristics, or material too large to be part of the main text (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies, or any other material for which insufficient space in the journals is available) etc., must be submitted as Supporting Information, for publication online. The lengths of printed articles will generally not exceed the following: Research Articles: 10 printed pages (approx. 20 double line-spaced manuscript pages with 5 displays); Brief Reports: 5 printed pages; Minireviews: 6 printed pages; Correspondence: 2 printed pages. However, longer manuscripts will be considered if the extra length is dictated by good scientific reporting practice.

#### *Supporting information*

Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>.

#### *Title page*

The title page should include: (1) a concise informative title for the work reported, (2) the names of all authors and their affiliation(s) where the work was conducted, (3) the name, full postal address, telephone and fax numbers, and email address of the corresponding author (one only), to whom all correspondence and proofs should be sent and (4) a running title of not more than 50 characters. Different current addresses of authors should appear as a footnote. Titles encapsulating the main advance ('Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation') are preferred over less informative general titles ('A study of . . .' 'Characterization of . . .' 'Diversity of . . .').

#### *Originality-Significance Statement*

Identify the key aspects of originality and significance that place the work within the top 10% of current research in environmental microbiology.

#### *Summary*

All papers must include a summary, not exceeding 200 words, that succinctly describes the principal findings of the work. Background information, and descriptions of what was done and how, should be avoided as redundant, unless essential to an understanding the findings, and then should be restricted to a sentence or two.

#### *The main text*

For Research Articles, the main text should be subdivided into Introduction, Results, Discussion, Experimental Procedures, Acknowledgments, References, Table and Figure legends. The Results and Discussion sections may be combined and can include additional subheadings. New or unfamiliar experimental procedures should be described in sufficient detail to enable the experiments to be reproduced. Well documented procedures should be adequately cited. For Brief Reports, Results and Discussion are combined, there is no section on Experimental Procedures, and essential experimental details should be incorporated into the corresponding figure and table legends. The preferred position of tables and figures should be indicated at the appropriate places in the manuscript. Footnotes should be avoided.



## Format

### Text

The text should be formatted double-spaced, typed consistently [e.g. care taken to distinguish between '1' (one) and 'l' (lower-case L), '0' (zero) and 'O' (capital O), etc.] with no hyphenation and automatic word-wrap (no hard returns within paragraphs), and line and page numbered consecutively.

### References

Authors should use the system of citing references illustrated below. Only full articles that have been published or are 'in press' may be included in the reference list. In the text, unpublished or submitted studies should be referred to as such (e.g. J. M. Smith, unpublished), or as a personal communication. It is the author's responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication. In the text, references should be inserted in parentheses in date order, as follows: (Pugsley, 1996; Matsunaga *et al.*, 1997). The reference list should be in alphabetical order according to the first-named author. Papers with two authors should follow those of the first-named author, arranged in alphabetical order according to the name of the second author. Articles with more than two authors should follow those of the first named author in chronological order; with multiple references from the same first author in a given year, please list the references in cited order. The title of the article must be included. For papers with up to seven authors, the names of all authors should be listed. For papers with eight or more authors, the first six names should be listed, followed by 'et al.'. Standard abbreviations of journal titles should be used, as in the Index Medicus.

The following provide examples:

Sahm, K., MacGregor, B.J., Jørgensen, B.B., and Stahl, D.A. (1999) Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slotblot hybridization in a coastal marine sediment. *Environ Microbiol* 1: 65-74.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., and Clark, D.P. (2008) *Brock Biology of Microorganisms*, 12th edn. New York, USA: Pearson Higher Education.

Finlay, B.L., Fenchel, T., and Embley, T.M. (1993) Methanogen endosymbiosis in anaerobic climates. In *Trends in Microbial Ecology*. Guerrero, R., and Pedros-Alio, C. (eds). Barcelona: Spanish Society for Microbiology, pp. 285-288.

References to material available on the World Wide Web can be given, but only if the information is available without charge to readers on an official site. Authors will be asked to provide electronic copies of the cited material for inclusion on the journal websites at the discretion of the Editors. The format for citations is as follows:

Beckleheimer, J. (1994). How do you cite URLs in a bibliography? [WWW document]. URL [www.nrlssc.navy.mil/meta/bibliography.html](http://www.nrlssc.navy.mil/meta/bibliography.html). Nevertheless, as web site content and addresses are constantly changing, authors are discouraged from citing key information available only on the web.

### Mathematics

In-line equations should be typed as text. The use of graphics programs and 'equation editors' should be avoided. Displayed equations are rekeyed by our typesetter.

### Tables

Tables should be typed as text, using either 'tabs' or a table editor for layout. Do not use graphics software to create tables.

### Figures

Please supply high quality digital versions of figures, preferably in EPS or TIFF format. TIFF files should not be produced by transferring images from a previous Powerpoint file, as this results in major loss in resolution. Photomicrographs should include a scaled bar and indicate the size (descriptions of magnification alone are not sufficient). Submitted photographic images should be scaled to publication size and must have an image resolution of 300 dpi or greater in TIFF format. Annotated photographs, line graphs and bar charts should be generated in EPS format for best quality of reproduction. For more detailed guidelines, please refer to [http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic\\_artwork\\_guidelines.pdf](http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic_artwork_guidelines.pdf).

Provide methodological details on image acquisition and image processing, including software and operations such as colourizing and other modifications.

Authors are reminded that it is not acceptable scientific conduct to modify any separate element within an image. Sometimes adjustments of the entire image in brightness, contrast and colour balance are justified if they do not misrepresent the original, observed data. Composite figures composed of grouped images such as insets from different fields or separate parts of gels must be explained in the figure legend and differentiated by use of dividing lines or other means to make composites unambiguous.

Please ensure that electronic artwork is prepared such that, after reduction to fit across one or two columns or two-thirds page width (80 mm, 169 mm or 110 mm respectively) as required, all lettering will be clear and easy to read, i.e. no labels should be too large or too small. Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse. No artwork should be incorporated into the text files. In the full-text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full-screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

Authors are encouraged to use colour displays, where appropriate:

#### *Cover Photographs*

The Editors welcome proposals of images related to the content of submitted papers that may be suitable for the covers of *EMI* and *EMIR*. If such an image is accepted and used as a cover, a free pdf offprint of the cover will be provided to the author.

### **Conventions**

#### *Abbreviations*

Standard abbreviations should be as recommended in *Quantities, Units, and Symbols* (The Royal Society, 1988). Abbreviations of non-standard terms should follow, in parentheses, their first full usage.

#### *Genetic nomenclature*

Standard genetic nomenclature should be used. For more detailed information, authors should consult Bachman (*Microbiol Rev* 47: 180-230, 1983) for *E. coli* K-12; Sanderson and Roth (*Microbiol Rev* 47: 310-453, 1983) for *Salmonella typhimurium*; Holloway *et al.* (*Microbiol Rev* 43: 73-102, 1979) for *Bacillus subtilis*; Perkins *et al.* (*Microbiol Rev* 46: 426-570, 1982) for *Neurospora crassa*; and the *Handbook of Genetics Vol. 1* (R. C. King, ed., Plenum Press, 1974) for *Saccharomyces cerevisiae*.

#### *Restriction enzymes*

*EMI* and *EMIR* have adopted the revised convention of naming restriction enzymes without italics. Previous designations like *EcoRI*, *KpnI*, *HindIII*, *SacI*, etc., are thus supplanted by *EcoRI*, *KpnI*, *HindIII*, *SacI*, etc. For more information on the updated guidelines to naming restriction enzymes, please consult Roberts *et al.* (*Nucleic Acids Res* 31: 1805-1812).

### **Submission of Manuscripts**

#### *Cover letter*

In the cover letter, (a) specify the title and authors, (b) provide a 1-2 sentence description of the advance reported and its significance, and confirm that (c) all of the reported work is original, (d) all authors have seen and approved the final version submitted, (e) all prevailing local, national and international regulations and conventions, and normal scientific ethical practices, have been respected, and (f) consent is given for publication in *EMI/EMIR*, if accepted.

#### *Online submission*

All manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/emi>. A user ID and password are required and can be obtained on the first use of the site. All file types are supported, but the following types are recommended: text in Microsoft Word or generic rich text format (RTF), figures in high resolution EPS or TIFF. Macintosh users are advised to add the correct three-letter filename suffix.

### *Reviewers*

Authors may nominate up to five referees appropriately qualified to judge the manuscript, though the Editors may or may not ultimately select some of these. Authors may also request that one or two specified persons do not act as reviewers. Should authors feel that they have a significant conflict with another PI, they should explain this in the cover letter and this information may be taken into consideration by the assigned editor.

### *Manuscript revision and re-submission*

There are four basic editorial decisions: Accept, Minor Revision, Reject with a possibility of submission of a new version, and Reject. A Reject decision is definitive and authors may not submit a new version of the manuscript to *EMJ/EMIR*. A Reject with a possibility of submission of a new version requires a major re-write of the manuscript and/or inclusion of significant new data, and thus the creation of a new manuscript, which will thus be assigned a new submission date. A Minor Revision decision implies that the paper can in principle attain the required standard of the Journal without major change. Editors may or may not have a revised manuscript reviewed (generally, by the original reviewers), in order to ascertain whether changes to the original manuscript adequately respond to the criticisms. If changes made do not result in a paper of the required standard, the revised manuscript will be definitively rejected; iterative improvements are not permitted. If a revised manuscript is accepted, the original submission date will be retained.

If any part of a study submitted to *EMJ/EMIR* is resubmitted at a later date, it must be sent to the same handling editor, noting the EM number of the previous version of the manuscript.

Files of re-submitted manuscripts must be supplied in editable formats, such as Word, for text and tables (authors should avoid embedding non-editable displays in their texts), and EPS or TIFF formats for figures. Submitted manuscripts containing non-editable files will be unsubmitted and authors will experience unnecessary delays in publication of their papers.

## **Accepted Manuscripts**

### *Copyright Assignment*

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Wiley Blackwell if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Authors will be required to sign a Copyright Transfer Agreement (CTA) for all papers accepted for publication. Signature of the CTA is a condition of publication and papers will not be passed for production unless a signed form has been received. Please note that signature of the Copyright Transfer Agreement does not affect ownership of copyright in the material. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various medium/circumstances

For questions concerning copyright, please visit [Copyright FAQ](#).

## **Color Figure & Page Charges**

When your article is published in Early View in Wiley Online Library, you will be emailed a link to RightsLink for Author Services allowing you to purchase optional color printing and pay any required page fees.



### Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. The electronic offprint is sent to the corresponding author, unless advised otherwise; therefore please ensure that the name, address and e-mail of the receiving author are clearly indicated on the manuscript title page. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

### Open Access

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

#### *For authors signing the copyright transfer agreement*

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

#### *For authors choosing OnlineOpen*

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA  
 Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA  
 Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

### Referrals to the Open Access Journal *MicrobiologyOpen*

This journal works together with Wiley's open access journal, *MicrobiologyOpen*, to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors will be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the Editor of *MicrobiologyOpen*. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. The Editor of *MicrobiologyOpen* will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. The journal seeks to publish research, pure or applied, that furthers our understanding of microbial interactions and microbial processes. *MicrobiologyOpen* is compliant with open access mandates and will facilitate wide dissemination of your research findings, while continuing to uphold the Wiley tradition of publishing excellence. Accepted papers can be published rapidly, typically within 15 days of acceptance. *MicrobiologyOpen* is a Wiley open access journal and article publication fees apply. For more information, please go to [www.microbiologyopen.com/info](http://www.microbiologyopen.com/info).



## Publication

Accepted manuscripts are transmitted directly to the Production Office, which deals with all enquiries related to publication. Wiley Blackwell's Author Services enables authors to track their article through the production process to publication online and in print, and to choose to receive automated e-mails at key stages of production, so they don't need to contact the production editor to check on progress. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a correct, regularly accessed e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

### *Proofs*

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online. Page proofs should be carefully proofread for any copyediting or typesetting errors. Online guidelines are provided within the system. No special software is required, all common browsers are supported. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email. Return of proofs via e-mail is possible in the event that the online system cannot be used or accessed.

### *Accepted Articles*

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. A completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article.

### *Early View*

Both *EMI* and *EMIR* are covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at <http://www.doi.org/faq.html>.

## Peer Access to Data and Materials

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical.

We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

### *Distribution of Strains and Experimental Materials*

In accordance with good scientific practice, and the need for important findings to be independently confirmed, the publication of an article in *EMI* or *EMIR* is subject to the understanding that authors will distribute freely any strains, clones, antibodies or other reagents not readily available described therein, for use in academic research.

*Sequence data*

Any nucleotide sequence data reported or referred to in a submitted manuscript must be accessible to reviewers (genbank now offers for certain genome, transcriptome or proteome databases a reviewer accession via temporary password) in one of the three major collaborative databases- DDBJ/EMBL/GenBank-which exchange data on a daily basis. If the manuscript is subsequently accepted and published, such data must become immediately available to the scientific community. The suggested wording for referring to accession number information is: These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345. Addresses are as follows:

DNA Data Bank of Japan  
Center for Information Biology  
National Institute of Genetics  
Mishima, Shizuoka 411  
Japan  
Tel: +81 559 81 6853  
Fax: +81 559 81 6849  
email: [ddbjsub@ddbj.nig.ac.jp](mailto:ddbjsub@ddbj.nig.ac.jp) (for data submissions)  
WWW URL: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

EMBL Nucleotide Sequence Submissions  
European Bioinformatics Institute  
Wellcome Trust Genome Campus  
Hinxton  
Cambridge, CB10 1SD  
UK  
Tel: +44 1223 494400  
Fax: +44 1223 494472  
email: [datasubs@ebi.ac.uk](mailto:datasubs@ebi.ac.uk)  
WWW URL: <http://www.ebi.ac.uk/>

GenBank  
National Center for Biotechnology Information  
National Library of Medicine  
Bldg. 38A, Rm 8N-803  
Bethesda, MD 20894  
USA  
Tel: +1 301 496 2475  
Fax: +1 301 480 9241  
email: [gb-sub@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:gb-sub@ncbi.nlm.nih.gov)  
WWW URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

*Functional genomics data sets*

Where possible, authors should submit functional genomics primary data sets to public data bases, such as the Gene Expression Omnibus (GEO), for micro-array data:

GEO  
National Center for Biotechnology Information  
National Library of Medicine  
Bethesda, MD 20894  
USA  
email: [geo@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:geo@ncbi.nlm.nih.gov)  
WWW URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>