

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ANÁLISES MOLECULAR E BIOQUÍMICA E
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE LAGOS DA MATA
ATLÂNTICA

DANIELA SANTOS PONTES

ORIENTADORA: Andréa Maria Amaral Nascimento
CO-ORIENTADOR: Edmar Chartone de Souza

BELO HORIZONTE - MG
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIELA SANTOS PONTES

**ANÁLISES MOLECULAR E BIOQUÍMICA E
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE LAGOS DA MATA
ATLÂNTICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética.

ORIENTADORA: Andréa Maria Amaral Nascimento

CO-ORIENTADOR: Edmar Chartone de Souza

**BELO HORIZONTE - MG
2007**

Todo o meu amor
Todo o meu apreço
Todo recomeço
Toda boa intenção
Toda idéia nova
Todas as noites que eu não dormi
Toda nova informação
Tantas saudades do que ainda não vivi
Vencer os contratempos
Passar mais tempo juntos
Consciência e paciência
Intensas modificações
E a mais completa certeza
De que tudo vai dar certo
Pra quem vem de longe
Pra quem faz rir
Pra quem esta no centro das decisões
Pra quem espera e sempre alcança
Pra quem é sem terra
Pra quem está sem tempo
Pra quem esta muito louco numa boa
Pra toda essa gente no sufoco
A mais completa certeza
De que tudo vai dar certo até o fim
Deixa a luz entrar
Todas as janelas da tua casa abertas
Toda a injustiça desse país a espera
Deixa a luz entrar

Composição: Rogério Flausino
Música: Jota Quest

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor incondicional, confiança e apoio, aos meus lindos irmãos, a toda minha família, ao Gú, pelo constante amor e incentivo, e aos meus orientadores pelo carinho e pelos ensinamentos científicos.

AGRADECIMENTOS

- À Deus por sempre iluminar o meu caminho.
- À Professora Andréa Nascimento, pelos ensinamentos, pela oportunidade e pela confiança depositada em meu trabalho. Além disso, agradeço pelo carinho, pela orientação e pela amizade durante todos esses anos. Obrigada por tudo!!!
- Ao meu co-orientador, Professor Chartone, pelos ensinamentos de vida e pelos ensinamentos científicos, pela atenção, felicidade e carinho. Você é um exemplo de vida!
- Aos professores Álvaro Cantini Nunes, Jacques Robert Nicoli, Leda Cristina Santana Mendonça-Hagler e Maria Sueli Soares Felipe por participarem da banca examinadora.
- Ao professor Francisco Barbosa e a toda a equipe do Peld. Muito obrigada pelo apoio de vocês!
- As Professoras Adlane e Mônica pelo carinho, conselhos e auxílio.
- A todos os professores da Genética que contribuíram para minha formação.
- A todos aqueles que passaram e que ainda fazem parte do LGM: Gabriel, Ana Alice, Letícia, Higgor, Cris, Fred, Carlinha, Abu, Glaydson, Lilia, Rosana, Ana Raquel, Ana Maria, Marcela, Luciana Cursino, Cláudia Hollatz, Walluzia, Giovane, Magui, Kênia, Ruy, Amanda, Michele, Marco Aurélio, Dani, Bianca, Maiara, Dulce, Cláudia, Rafa, Paty, Mariana, Ju, Gilka, Renata, Carol, Flaviane, pela convivência diária, pelo apoio e por tudo de bom que passamos juntos. Em especial aos meus filhos Marcela, Rafa e Fla pela ajuda, apoio e carinho, adoro muito vocês!!!
- À Paixão, Andréa e Maria Rosa pela ajuda, convivência e carinho! Valeu!
- À Marina pela amizade e por ter sempre me ajudado. Obrigada pelos bons momentos e pelas risadas!

- Aos amigos da Pós-Graduação em Genética pelo companheirismo e cumplicidade durante esse tempo que estivemos juntos! Em especial a Rê, a Carol, a Simone e ao Rodrigo.
- Aos amigos do LGCM: Paulinha (neta), Clê, Luís, Tiago, Marcele, Valéria, Kátia e Sarah pela amizade e pelos nossos super momentos de descontração (cervejinhas!!!).
- Aos amigos do LBEM e GenPop pelo apoio e ajuda. Valeu!!!
- Aos meus amigos Sávio e Miyoshi pela troca de idéias e experiências, pela amizade e por todos momentos fantásticos que passamos juntos! Amo vocês!!!
- À minha amiga Mi, que eu amo tanto, pela nossa amizade e cumplicidade, pelos momentos de apoio, conselhos e por tudo de bom que passamos juntas nesses anos!!!
- A minha sempre filha e amiga Fê, pelo carinho, pelo apoio em todos os momentos que precisei e pela eterna amizade! Amo você!!!
- .As minhas amigas da lama: Kika e Jú pela amizade e apoio que sempre me deram! Vocês são tudo de bom! Amo muito vocês!!!!
- Aos amigos da 324 pela amizade e pelos momentos de diversão para aliviar a tensão!!! Positivo e operante!!!
- A Joana por ter cuidado de mim e da minha bagunça. Obrigada por tudo que você fez por mim!
- A minha prima Bina que sempre esteve ao meu lado, me dando a maior força, nos momentos felizes e nos momentos difíceis. Amo você!
- Aos meus amigos Érika e Franklin e ao meu xodó Vitor por estarem sempre presentes.
- Ao meu filhote Thorzinho por ser minha companhia fiel durante os dias de intenso trabalho no computador.
- A Dona Enny por ser uma segunda avó e sempre ter acreditado e torcido por mim. Obrigada pelo enorme carinho!

- A minha super cunhada Marina pela amizade e carinho. Você é tudo de bom!
- As minhas GRANDES AMIGAS: Maíra, Rê, Ge, Lú, Gabi, Ana, Quel, Nina e Renatinha pela nossa eterna amizade! Obrigada pelo apoio e por terem torcido por mim. Amo vocês!
- Aos meus avós, que mesmo lá de cima, sempre estiveram ao meu lado.
- A minha maravilhosa e amada família: tios, tias, primos e primas, pela união, alegria, incentivo e apoio. Amo vocês! Em especial ao meu padrinho Hildebrando que esteve sempre torcendo por mim e me incentivando!!!
- Aos meus irmãos, Alberto e Bruno, pelo amor e amizade. Amo muito vocês!
- Aos meus queridos pais de quem tanto tenho orgulho pelo apoio constante, conselhos, confiança, amizade, paciência, força e amor. Obrigado por sempre acreditarem em mim! Esta conquista é nossa. Amo muito vocês!
- Ao Gú, meu grande amor, pela constante compreensão, paciência, lealdade e amor. Obrigado por estar sempre ao meu lado, torcendo por mim! Te amo muito!!!
- Enfim a todas aquelas pessoas que de alguma forma me ajudaram e acreditaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO	15
ABSTRACT.....	16
1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	17
2. INTRODUÇÃO	19
2.1. Considerações gerais.....	19
2.2. A diversidade bacteriana.....	20
2.3. Genética ecológica: a resistência bacteriana aos antimicrobianos	22
2.3.1. Resistência aos antimicrobianos em ambientes naturais.....	25
3. OBJETIVOS	28
3.1. Geral.....	28
3.2. Específicos.....	28
Capítulo 1.....	29
Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity	
Capítulo 2.....	41
Molecular identification and analysis of antimicrobial resistance of bacteria isolated from oligotrophic lakes in a tropical region	
Capítulo 3.....	77
Phenotypic and genetic analysis of <i>Enterobacter</i> spp. from a Brazilian oligotrophic freshwater lake	
4. DISCUSSÃO	87
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
7. ANEXOS.....	98
7.1. METODOLOGIA COMPLEMENTAR.....	99
7.1.1. Área de estudo.....	99
7.1.2. Amostras de água e isolamento bacteriano.....	99
7.1.3. Estocagem.....	100
7.1.4. Processamento e análise filogenética das seqüências.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização do operon do rRNA ribossômico..... 20

Capítulo 1

Figure 1: Useful culture dependent and culture independent methods. *RFLP* restriction fragment length polymorphism, *ARDRA* amplified rDNA restriction analysis, *DGGE* denaturing gradient gel electrophoresis, *TGGE* temperature gradient gel electrophoresis, *SSCP* single-stranded conformation polymorphism, *FISH* Fluorescence in situ hybridization..... 31

Figure 2: Scheme of construction and screening of environmental metagenomic libraries....
..... 36

Capítulo 2

Figure 1: Rio Doce State Park and sampling site locations 1: Jacaré Lake; 2: Dom Helvécio Lake and 3: Gambazinho Lake..... 64

Figure 2: Neighbor-joining analysis of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Jacaré lake in 2003. Isolates with names beginning with JA were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap resamplings were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences..... 65

Figure 3: Neighbor-joining analysis of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Jacaré lake in 2005. Isolates with names beginning with JA were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap resamplings were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences..... 66

Figure 4: Neighbor-joining analysis of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Gambazinho lake in 2003. Isolates with names beginning with GA were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap resamplings were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences..... 67

- Figure 5:** Neighbor-joining analysis of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Gambazinho lake in 2005. Isolates with names beginning with GA were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap resamplings were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences..... 69
- Figure 6:** Neighbor-joining analysis of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Dom Helvécio lake in 2003. Isolates with names beginning with DH were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap resamplings were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences..... 70
- Figure 7:** Neighbor-joining analysis of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Dom Helvécio lake in 2005. Isolates with names beginning with DH were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap resamplings were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences..... 71
- Figure 8:** Relative abundance of taxonomic groups in oligotrophic lakes based on analyses of the 16S rRNA gene.....73
- Figure 9:** UPGMA cluster of isolates from Jacaré (J), Dom Helvécio (D) and Gambazinho(G) lakes in July 2003 (1) and September 2005 (2).....74
- Figure 10:** Principal components analysis ordination plot for the 16S rRNA gene. The percent variation explained by each principal component is indicated on the axis labels. Lakes are represented by the following symbols: Dom Helvécio ■, Gambazinho ●, and Jacaré ▲. Closed symbols represent samples collected in July 2003 and open symbols represent samples collected in September 2005. 75
- Figure 11:** MAR index average. Means between lake categories within a year with the same letter are not significantly different by Duncan's test ($P < 0.05$).. 76

Capítulo 3

- Figure 1:** Neighbour-joining tree based on the analysis of partial 16S rDNA sequences of *Enterobacter* sp. isolates and related *Enterobacter* species, including *E. cloacae* ATCC

13047. One-thousand bootstrap resamplings were used to evaluate the robustness of the inferred trees. 80

Figure 2: Figure 2. tDNA-PCR patterns of reference strains and isolates of *Enterobacter* by electrophoresis in a 2% agarose gel. Lane M, molecular size marker (1 Kb Plus-Invitrogen); lane 1, negative control; lanes 2 and 3, *E. cloacae* ATCC strains (13047 and 23355); lane 4, *E. aerogenes* ATCC 13048; lane 5, *E. sakazakii* ATCC 29004; lanes 6 to 25, environmental isolates of *E. cloacae*; lanes 26 and 27, environmental isolates of *Enterobacter* species JA24 and JA63 (respectively). 81

Figure 3: ITS-PCR patterns of reference strains and isolates of *Enterobacter* by electrophoresis in a 2% agarose gel. Lane M, molecular size marker (1 Kb Plus-Invitrogen); lane 1, negative control; lanes 2 and 3 *E. cloacae* ATCC strains (13047 and 23355); lane 4, *E. aerogenes* ATCC 13048; lane 5, *E. sakazakii* ATCC 29004; lanes 6 to 25, environmental isolates of *E. cloacae*, lanes 26 and 27; environmental isolates of *Enterobacter* species JA24 and JA63 (respectively). 82

Figure 4: ERIC-PCR patterns of reference strains and isolates of *Enterobacter* by electrophoresis in a 2% agarose gel. (A) Lane M, molecular size marker (1 Kb Plus-Invitrogen); lane 1, negative control; lanes 2 and 3 *E. cloacae* ATCC strains (13047 and 23355); lane 4, *E. aerogenes* ATCC 13048; lane 5, *E. sakazakii* ATCC 29004; lanes 6 to 25, environmental isolates of *E. cloacae*; lanes 26 and 27, environmental isolates of *Enterobacter* species JA24 and JA63 (respectively). (B) Dendrogram constructed by UPGMA with *Enterobacter* reference strains and isolates. 82

Figure 5: Antimicrobial resistance in environmental isolates of *Enterobacter* species. 83

Figure 6: Plasmids from *Enterobacter* isolates. *E. cloacae*: lanes 1 to 9 and 11 to 21(JA01, JA02, JA05, JA06, JA13, JA16, JA18, JA22B, JA23, JA27, JA30, JA32, JA37B, JA39, JA44B, JA45B, JA46, JA49B, JA53, JA55). *Enterobacter* sp: lanes 10 and 23 (JA24 and JA63). 84

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Erro! Nenhuma entrada de índice de figuras foi encontrada. **Capítulo 2**

Table 1: Antimicrobial resistance and multiple resistance percentage in <i>Enterobacter</i> isolates sampled during the dry season from Jacaré, Gambazinho and Dom Helvécio lakes in Brazil.....	60
Table 2: Antimicrobial resistance and multiple resistance percentage in <i>Acinetobacter</i> isolates sampled during the dry season from Jacaré, Gambazinho and Dom Helvécio lakes in Brazil.....	61
Table 3: Antimicrobial resistance and multiple resistance percentage in <i>Pseudomonas</i> isolates sampled during the dry season from Jacaré, Gambazinho and Dom Helvécio lakes.....	62
Table 4: Antimicrobial resistance of antimicrobials against all isolates from Jacaré, Dom Helvécio and Gambazinho lakes.....	63

Capítulo 3

Table 1: Primers used in this study.....	80
Table 2: Antimicrobial susceptibility of <i>Enterobacter</i> isolates from an oligotrophic freshwater lake.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Ak	- Amicacina
Am	- Amoxicilina/ ácido clavulânico
Ap	- Ampicilina

ARDRA	- “Amplified ribosomal restriction analysis”
Cm	- Cloranfenicol
DGGE	- “Denaturing gradient gel electrophoresis”
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EMB	- “Eosin Methylene Blue”
ERIC	- “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”
FEDESA	- Federação Européia de Saúde Animal
FISH	- “Fluorescence in situ hybridization”
Gm	- Gentamicina
HCl	- Ácido clorídrico
Hg	- Mercúrio
HGT	- “Horizontal Gene Transfer”
ITS	- Região intergênica 16S-23S rDNA
Kg	- Quilograma
Km	- Kanamicina
Km ²	- Quilometro quadrado -
m	- Metro
M	- Molar
Meq	- Mili-equivalente
mg	- Miligrama (10 ⁻³ g)
MIC	- “Minimun inhibitory concentration”
MH	- Meio de cultura Mueller-Hinton
min	- Minuto
ml	- Mililitro (10 ⁻³ L)

μl	- Microlitro (10^{-6} L)
mM	- Milimolar
μM	- Micromolar
mRNA	- Ácido ribonucléico mensageiro
ng	- Nanograma (10^{-9} g)
Nx	- Ácido nalidíxico
pb	- Pares de base
PCA	- "Principal Components Analysis "
PCR	- "Polymerase Chain Reaction" / Reação em Cadeia da Polimerase
PERD	- Parque Estadual do Rio Doce
rDNA	- Gene codificador de RNA ribossômico
RDP	- "Ribosomal Database Project II"
RFLP	- "Restriction Fragment Length Polimorphism"
rRNA	- Ácido ribonucléico ribossômico
SDS	- "Sodium dodecyl sulfate"
Sm	- Estreptomicina
SRB	- "Sulfate-reducing bacteria"
SSCP	- "Single-Stranded Conformation Polymorphism"
SSU	- "Small Subunit"
TBE	- Tampão Tris borato EDTA
Tc	- Tetraciclina
tDNA	- Gene codificador de RNA transportador
TE	- Tris-EDTA
TGGE	- "Temperature gradient gel electrophoresis"
TN	- Nitrogênio total
TP	- Fósforo total

- tRNA - Ácido ribonucléico transportador
- TSA - Ágar triptona de soja
- U - Unidade
- UPGMA - “Unweighted Pair Group Mean Averages”

RESUMO

Considerando o papel essencial das bactérias nos ciclos biogeoquímicos dos ecossistemas aquáticos, o aumento de sua resistência aos antimicrobianos nesses ambientes naturais e a falta de conhecimento da fisiologia, ecologia e genética desses microrganismos em lagos da Mata Atlântica, este trabalho teve como objetivo principal: identificar bactérias Gram-

negativas em três lagos oligotróficos da região do Parque Estadual do Rio Doce (PERD) – trecho médio da bacia do Rio Doce –, por meio de técnicas bioquímicas e moleculares utilizando, principalmente, o gene de rRNA 16S, e analisar a susceptibilidade das mesmas a diferentes antimicrobianos. As coletas das amostras de água foram efetuadas nos períodos de seca nos anos de 2003 e 2005. Os isolados bacterianos foram identificados por sequenciamento parcial do gene de rRNA 16S como pertencentes aos gêneros: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Morganella*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Stenotrophomonas Aquitalea* e *Chryseobacterium*, com predominância dos três primeiros. Em geral, a composição das comunidades bacterianas variou nos dois períodos amostrados. Os testes de susceptibilidade mostraram uma alta frequência de resistência nesses ambientes aquáticos. A multiresistência mostrou-se um fenômeno comum entre os isolados. A ampicilina foi o marcador de resistência mais frequente nos três lagos estudados. Os isolados bacterianos resistentes a ampicilina foram analisados quanto à presença do gene *bla*_{TEM-1}, codificador da enzima TEM-1, a β -lactamase plasmidiana mais frequente em bactérias Gram-negativas e principal determinante de resistência aos β -lactâmicos. Os resultados mostraram o potencial e praticidade das técnicas moleculares, baseadas em sequências do gene de rRNA 16S e *fingerprinting* (ITS, tDNA e ERIC), na identificação de isolados bacterianos e na disseminação da resistência em ambientes naturais, mostrando que esses lagos são reservatórios de bactérias resistentes e de genes de resistência.

ABSTRACT

Considering that bacteria play essential roles in biogeochemical cycles in aquatic ecosystems, the increase of antimicrobial resistance among bacteria found in natural environments and the lack of knowledge about physiology, ecology and genetic of these microorganisms in lakes of Atlantic Forest, the present study had the main purpose: identify culturable Gram-negative

bacteria present in three oligotrophic lakes in the State Park of Rio Doce (PERD)- middle of Rio Doce basin -, using biochemical and molecular techniques mainly by analyzes of 16S rRNA gene, and analyze antimicrobial resistance among different bacteria. The waters were sampled in dry season in the years 2003 and 2005. The isolates identified by partial sequencing of rRNA 16S belonged to genera: *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Morganella*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Stenotrophomonas Aquitalea* e *Chryseobacterium*, which the first three predominated. In general, the bacterial communities composition varied between the periods of sampling. Susceptibility tests showed a high level of resistance in these aquatic environments. Multiresistance showed to be a common phenomenon among the isolates. Ampicillin showed to be the most frequent marker of resistance along the three sites of samples. The bacterial isolates resistant to ampicillin were analyzed for *bla*_{TEM-1} gene presence, which encodes the enzyme TEM-1, the plasmidial β -lactamase most frequent in Gram-negative bacteria and the wide determinant β -lactams resistance as penicillins and cephalosporins. The results showed the potential and simplicity of the molecular techniques based on 16S rRNA gene sequences and fingerprinting (ITS, tDNA e ERIC), on identification of environmental isolates and the dissemination of resistance in preserved or impacted oligotrophic lakes which might be reservoirs of resistant bacteria and resistance genes.

1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O isolamento e identificação de bactérias, assim como o conhecimento da resistência aos antimicrobianos, ainda são escassos em ambientes naturais no Brasil. Alguns aspectos inerentes às bactérias, associados à vasta extensão territorial e riqueza de biomas brasileiros, tornam esse tipo de estudo uma tarefa complexa. Isso se reflete diretamente na

identificação de muitos grupos microbianos, seja na utilização de esquemas taxonômicos em estudos ambientais ou na falta de informações sobre as descrições de espécies publicadas, que geram problemas na identificação apropriada de diversos isolados. Essas deficiências tornam o processo de identificação desses isolados ambientais um trabalho intenso e impreciso. Esse fato ocasiona falhas em muitos levantamentos de diversidade de bactérias que utilizam metodologias onde os isolados são, na maioria das vezes, identificados apenas em nível de gênero ou família. Em alguns estudos, é possível que a realização de levantamentos de diversidade seja feita com base na classificação de grandes grupos funcionais em uma dada comunidade microbiana ou ambiente ainda não explorado. Nesses tipos de levantamentos, alguns isolados podem representar espécies ainda desconhecidas para a ciência, além de contribuir para a compreensão do fenômeno da resistência em ambientes naturais, principalmente em regiões de megadiversidade biológica, como a Mata Atlântica.

A Mata Atlântica é a segunda floresta tropical de maior expressividade na América do Sul, principalmente no Brasil, e está localizada na escarpa da Serra do Mar, que faz parte do Domínio Florestal Atlântico Tropical. A atribuição oficial da Mata Atlântica como Reserva da Biosfera confirma sua categoria de floresta tropical úmida, uma das mais ameaçadas de extinção do mundo, tornando imprescindível a conservação da sua biodiversidade. Essa mata é um dos últimos refúgios de um dos ecossistemas mais ricos do mundo. Por isso, a Mata Atlântica é um ambiente extremamente interessante para explorar a diversidade bacteriana desconhecida, o fenômeno da resistência aos antimicrobianos e seus impactos ambientais, a frequência de genes de resistência existentes e aumentar o conhecimento sobre a ecologia e fisiologia da sua comunidade microbiana, uma forma de contribuir para a conservação e manutenção de uma parcela significativa da sua biodiversidade.

A variabilidade genética e versatilidade das bactérias contribuem amplamente para eficiência do fenômeno de resistência que tem se disseminado por diversos ambientes e entre diferentes gêneros e espécies bacterianas. A resistência antimicrobiana sempre foi vista como um problema na eficácia terapêutica. Entretanto, atualmente, além de um problema clínico, tornou-se também um problema socioeconômico e ecológico, pois o ambiente natural vem sofrendo cada vez mais a ação antropogênica. Diante do problema causado pela resistência e da raridade de dados sobre a genética e evolução desse fenômeno na natureza, torna-se indispensável avaliar o problema analisando outras bactérias, que não só as essencialmente patogênicas, que também fazem parte de

ecossistemas naturais. Além disso, ainda é escasso o conhecimento desse fenômeno e da identificação de bactérias em ambientes naturais no Brasil.

O presente estudo foi realizado no PERD, atualmente o maior remanescente da Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais, uma reserva ecológica localizada no trecho médio da bacia do Rio Doce. Uma vez que o conhecimento sobre a comunidade bacteriana nessa região é pequeno, o isolamento e identificação de bactérias e a análise do fenômeno da resistência, por técnicas bioquímicas, fisiológicas e moleculares são relevantes para caracterização da microbiota desses ambientes naturais.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Considerações gerais

A biosfera é completamente dependente do metabolismo dos microrganismos e da interação entre eles. O estudo dos microrganismos é importante não apenas devido às

doenças causadas por eles, mas pelo fato de que conhecer a microbiota é compreender a biosfera (Fry, 2000; Schleifer, 2004).

As bactérias são importantes componentes da biota da Terra, pois participam de processos ecológicos fundamentais na manutenção de ecossistemas (Fry, 2000; Rossello-Mora and Amann, 2001; Torsvik et al., 2002; Schleifer, 2004). Esses microrganismos estão amplamente distribuídos pelos mais diversos habitats do planeta: água, terra, ar e seres vivos, incluindo o homem (Bryson and Szybalski, 1952; Kellenberger, 1994; Lawrence, 1999; Fry, 2000). Graças a sua simplicidade morfológica e sua enorme variabilidade genética e metabólica, muitos microrganismos adaptaram-se evolutivamente sendo capazes de viverem em condições ambientais extremas, como em faixas de temperatura que variam desde abaixo de 0°C a acima de 100°C, em extremos de salinidade, de pH e de pressão (Hugenholtz et al., 1998b; Arber, 2000; Levin and Bergstrom, 2000; Rodriguez-Valera, 2002; Torsvik et al., 2002; Schleifer, 2004).

A flexibilidade genética e a versatilidade das bactérias permitem que elas respondam rapidamente às mudanças do ambiente. Existem dois mecanismos que podem explicar a origem e variabilidade da informação genética entre as bactérias. Essa variabilidade pode surgir por meio de mutação ou, principalmente, pela aquisição de genes exógenos de organismos filogeneticamente próximos ou distantes, por meio dos mecanismos de transferência gênica horizontal: conjugação, transformação e transdução (Tenailon et al., 2001; Levy, 2002). Estes mecanismos são os responsáveis pela troca de informação genética entre as mais diversas bactérias. A diversidade bacteriana reflete seu genoma extremamente dinâmico que pode mutar, adquirir e perder genes, formando um conjunto genômico de alta plasticidade que permite a adaptação a um determinado *habitat*, criando oportunidades para especiação (Davison, 1999; Lawrence, 1999; Kerr et al., 2002; Kurland et al., 2003). As alterações responsáveis pela plasticidade do genoma são, em sua maioria, resultantes da transferência gênica horizontal (Dobrindt and Hacker, 2001)

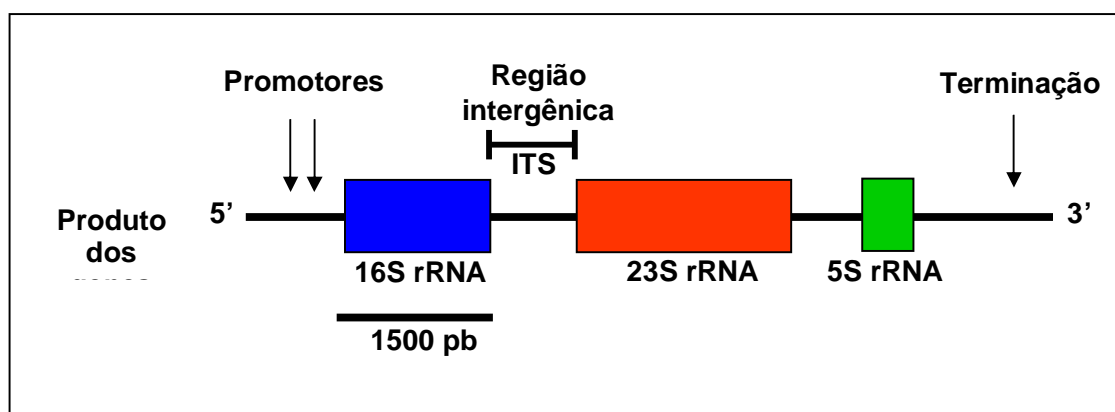
2.2. A diversidade bacteriana

As células procarióticas surgiram há cerca de 3,8 bilhões de anos. A longa história dessas formas de vida pode, em parte, explicar a imensa diversidade genética, morfológica e fisiológica desses microrganismos (Torsvik et al., 2002).

O estudo do universo e da diversidade bacteriana é uma das áreas com maior crescimento nos últimos anos (Nee, 2003). Estudos baseados na análise da diversidade de

bactérias do ambiente pelo emprego de métodos moleculares têm revelado um cenário composto por uma rica diversidade de organismos até então desconhecidos ou não estudados em laboratório (Ward et al., 1990; Kuske et al., 1997; Pace, 1997; Hugenholtz et al., 1998a; Lyautey et al., 2005).

Em bactérias existem três genes que codificam os rRNAs 16S, 23S e 5S, componentes essenciais dos ribossomos, os quais estão envolvidos na tradução do RNA mensageiro em polipeptídeos (Figura 1). Entre os genes de rRNAs presentes em bactérias o gene de rRNA 16S é o que vem sendo mais utilizado para as análises de diversidade e filogenia. Embora o rRNA 5S já tenha sido utilizado para estudos filogenéticos, seu tamanho –aproximadamente 120 pb – limita as informações obtidas através dessa molécula, e estudos com o rRNA 23S, 2.900 pb, – unidade com maior informação e em muitos casos com maior resolução para reconstruções filogenéticas do que o rRNA 16S – são restritos. Dessa forma, as técnicas moleculares utilizam o sequenciamento do gene de rRNA 16S, de aproximadamente 1.500 pb. Portanto, devido ao seu tamanho satisfatório e presença de regiões altamente conservadas entre as espécies ele é considerado um gene-marcador de fácil manipulação para a realização de experimentos moleculares (Rossello-Mora and Amann, 2001; Baker et al., 2003).



Com a automação das técnicas de sequenciamento dos ácidos nucleicos, estudos

SO Figura 1 - Organização do operon do rRNA ribossômico

vidos,

ba zaram

muitas informações sobre as espécies presentes em amostras ambientais, sem a necessidade de isolamento e cultivo prévios, fato que revolucionou a compreensão da filogenia microbiana. (Woese, 1987; Dunbar et al., 1999; Fry, 2000; Jaspers et al., 2001; Dahllorf, 2002; Rodriguez-Valera, 2002; Torsvik et al., 2002; Nee, 2003; Keller and Zengler,

2004; Kemp and Aller, 2004; Rodriguez-Valera, 2004). A base da pesquisa para análise da diversidade molecular bacteriana, em geral, consiste em isolar indivíduos de uma comunidade que são submetidos a análises diretas do seu DNA, usando métodos *in situ*, ou através da extração direta do DNA de amostras ambientais. Dessa forma, genes de interesse, ou parte deles, podem ser amplificados utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e avaliados utilizando-se diversas técnicas, como clonagem, sequenciamento, hibridização por sondas, entre outras (Dahllof, 2002).

Em 1987, Woese propôs um sistema de classificação filogenética para as espécies baseado na divergência das seqüências das moléculas de genes de rRNAs da sub-unidade menor ribossômica (16S rRNA, para procariotos ou 18S, para eucariotos) de 500 organismos cultiváveis já conhecidos. Nesse estudo ele classificou os organismos vivos em três domínios: Bacteria, Archaea e Eucaria (Woese, 1987). A partir de então, esse sistema filogenético baseado na análise do gene de rRNA 16S passou a representar um modelo interessante para o estudo da evolução e a relação entre as mais diversas espécies existentes (McInerney et al., 2002).

O sequenciamento do gene de rRNA 16S e as análises comparativas entre eles mostraram ser de alta relevância para os parâmetros universais dos estudos das relações filogenéticas entre os procariotos acima do nível de espécies. Entretanto, quanto mais se disponibiliza informação sobre as seqüências do gene de rRNA 16S, mais se torna evidente sua limitação para o estudo de indivíduos proximamente relacionados. Dessa forma, novas metodologias devem ser adicionadas para resolução desse problema (Rossello-Mora and Amann, 2001). A análise de genes *housekeeping* e a pesquisa metagenômica são estratégias que vêm sendo utilizadas para o estudo da diversidade e fisiologia bacteriana, além da identificação de novos genes com potencial biotecnológico.

Nos ambientes naturais, remanescentes da Mata Atlântica, como em lagos do trecho médio da bacia do Rio Doce, são raríssimos os estudos sobre a microbiota bacteriana (Petruccio et al., 2006). O estudo de isolados bacterianos cultiváveis e não cultiváveis é de grande relevância para o conhecimento desse universo, praticamente não explorado, uma vez que as bactérias exercem papéis fundamentais na ecologia dos sistemas aquáticos.

2.3. Genética ecológica: a resistência bacteriana aos antimicrobianos

A grande variabilidade genética apresentada pelas bactérias permite que elas sejam capazes de responder rapidamente às mudanças do ambiente. A introdução de agentes

antimicrobianos e a pressão seletiva exercida por eles e pelo ambiente levam à seleção e uma rápida evolução do genoma desses microrganismos, tornando-os resistentes a essas drogas. A variabilidade genética tem como causa a mutação e/ou aquisição de genes exógenos pelos mecanismos de transferência gênica horizontal (TGH) (Levy, 1997; Kolár et al., 2001; Tenaillon et al., 2001; Conly, 2002).

A mutação espontânea e a recombinação de genes são eventos naturais e primordiais para a variabilidade genética e evolução dos seres vivos e são os responsáveis, ao lado da pressão seletiva, pelo surgimento de resistência aos antimicrobianos. A flexibilidade genética e a versatilidade das bactérias contribuem amplamente para eficiência do fenômeno de resistência que tem se disseminado por diversos ambientes e entre diferentes gêneros e espécies bacterianas (Levy, 1997). As bactérias tornam-se resistentes aos efeitos tóxicos dos antimicrobianos pela alteração, substituição ou superprodução do alvo, por modificação ou inativação da droga por enzimas e por inibição da permeabilidade e efluxo da droga (Chartone-Souza, 1998; White and Mcdermott, 2001).

A TGH é um mecanismo amplamente disseminado entre as bactérias, incluindo espécies filogeneticamente distantes, evidenciado pela transferência de material genético exógeno em adição ao genoma de uma bactéria, a qual possui a capacidade de reter genes que codifiquem funções favoráveis para sua sobrevivência. Esse processo é principalmente relevante na associação entre a aquisição de aptidões particulares e a capacidade de exploração de um novo ambiente, permitindo que as bactérias se tornem competidoras ativas em um nicho até então não explorado por elas (Lawrence, 1999). Vários fatores contribuem para a rápida disseminação da resistência entre as bactérias, principalmente a exposição aos antibióticos, que atuam como agentes seletivos, e a presença e transferência promíscua dos genes de resistência por elementos genéticos móveis: plasmídios, transposons, sistema integrons-cassete e fagos. A capacidade desses elementos de estabelecer associações genéticas entre espécies bacterianas totalmente diferentes os tornam principais componentes na dispersão dos determinantes de resistência (Levy, 1997; Witte, 2000; White and Mcdermott, 2001).

Desde a descoberta da penicilina, os antibióticos vêm sendo amplamente utilizados no tratamento de doenças infecciosas, nas medicina humana e veterinária, na agricultura e pecuária. A utilização constante e indiscriminada dos antibióticos promoveu a disseminação de linhagens bacterianas resistentes a tais drogas, ao contribuir para seleção das mesmas e eliminação daquelas que eram susceptíveis (Levy, 1997; O'Brien, 2002). A seleção e a dominância das linhagens bacterianas resistentes em um determinado ambiente exposto aos

antimicrobianos estão diretamente associadas à resistência intrínseca ou adquirida desses microrganismos (Rowe-Magnus and Mazel, 1999). Hoje existem diversas bactérias que são resistentes a diversos antimicrobianos, fenômeno denominado de resistência múltipla, diretamente ligado à quantidade de antibióticos e a forma com que os mesmos vêm sendo utilizados não só na medicina, mas em diversas outras áreas. A emergência dos genes de resistência aos antimicrobianos, em linhagens clinicamente relevantes e na microbiota comensal, vem se tornando uma preocupação mundial para a saúde pública humana e animal.

A resistência aos antibióticos sempre foi vista como sendo um problema na eficácia terapêutica. Entretanto, atualmente, vem se observando que esse fenômeno é também um problema de ordem ecológica (Witte, 2000; Alonso et al., 2001; Aminov et al., 2001; Chee-Sanford et al., 2001; Levy, 2002; Summers, 2002). A poluição causada pela ação antropogênica, por metais pesados como o mercúrio e outras substâncias tóxicas, vem contribuindo significativamente para o aumento da resistência a esses compostos em ambientes naturais (Bruins et al., 2000; McArthur and Tuckfield, 2000; Alonso et al., 2001; Díaz-Cruz et al., 2003; Nascimento and Chartone-Souza, 2003; Reinthaler et al., 2003). Operons de resistência ao mercúrio e antimicrobianos são freqüentemente encontrados em plasmídios, transposons conjugativos e integrons, fornecendo um sistema adequado para o estudo da TGH em populações naturais de bactérias (McArthur and Tuckfield, 2000).

Em 1997, dados estatísticos da Federação Europeia de Saúde Animal (FEDESA) indicaram que, por ano, cerca de 5.460.000 Kg de antibióticos foram utilizados no tratamento de doenças humanas, 3.465.000 Kg na medicina veterinária e 1.575.000 Kg como aditivo em ração animal, como promotores de crescimento (Teuber, 2001). Nos Estados Unidos foi estimado que um total de 23×10^6 Kg de antibióticos foi utilizado, anualmente também nessas áreas (Levy, 2002). Esses dados são extremamente preocupantes e os números mostram a considerável disseminação geográfica no uso abusivo dessas drogas que tem como consequência a criação de ambientes favoráveis para o estabelecimento de bactérias resistentes (Okeke and Edelman, 2001).

A introdução dos antimicrobianos e de compostos tóxicos em ambientes naturais é resultado da combinação de diferentes fatores: produção desses produtos em larga escala pelas indústrias; a quantidade utilizada; frequência de liberação desses compostos em ecossistemas naturais, como solo, rios, lagos e oceanos e a capacidade de absorção e decomposição metabólica dos compostos nesses ambientes. Diferentes interações entre a microbiota bacteriana e os diversos ecossistemas podem ocorrer durante a transferência dos

genes de resistência entre esses microrganismos (Nwosu, 2001). Além disso, as bactérias possuem uma enorme capacidade de moverem-se entre os ecossistemas: do homem e do animal para o solo e a água, ou vice-versa, fator que amplia a disseminação de genes de resistência por essas bactérias, que podem ser facilmente transferidos entre os organismos e os diversos ecossistemas (Nwosu, 2001). A acumulação de antimicrobianos nesses ambientes, que acabam se tornando verdadeiros reservatórios desses genes, pode ocasionar a diminuição da biodiversidade das populações microbianas naturais, além de ter influência nos processos bióticos dos ecossistemas (Witte, 2000; Nwosu, 2001; Teuber, 2001; Summers, 2002; Costanzo et al., 2005). Deve-se acrescentar que muitos microrganismos, como fungos e bactérias, são produtores naturais de antimicrobianos podendo liberá-los no ambiente. A grande maioria das bactérias Gram negativas, por exemplo, produz naturalmente pequenas quantidades de β -lactamases, provavelmente, como resposta à presença no ambiente de β -lactâmicos considerados uma das mais importantes classes de antimicrobianos. A resistência a antibióticos β -lactâmicos entre bactérias é, principalmente, mediada pela síntese de β -lactamases, responsáveis pela inativação do composto. A enzima TEM-1 é o tipo de β -lactamase plasmidiana mais frequente em bactérias Gram-negativas, e a maior determinante da resistência aos β -lactâmicos, como as penicilinas e cefalosporinas (Fluit et al., 2001). A presença dos genes *bla*_{TEM} em plasmídios e transposons, associada à alta pressão seletiva dos β -lactâmicos, facilitou sua disseminação entre as mais diferentes espécies de bactérias. Além disso, os genes *bla*_{TEM} possuem uma notável tendência de sofrer mutações, gerando enzimas com amplo espectro de ação (Mabilat and Courvalin, 1990; Huang et al., 1996; Bradford, 2001; Heritage et al., 2001).

Os efeitos ecotoxicológicos dos antimicrobianos ainda não são bem conhecidos embora constituam uma classe de compostos ativos que podem interferir em sistemas biológicos específicos. Compostos solúveis em água podem contaminar águas profundas e se acumularem em sedimentos ou em solos. Os rios, que muitas vezes recebem esgotos ou descargas de poluentes, por exemplo, são um dos principais recursos de água para consumo direto ou indireto por homens e animais e a liberação desses poluentes contribuem amplamente para a manutenção e disseminação da resistência em diferentes ecossistemas (Goñi-Urriza et al., 2000; Isidori et al., 2005). Contudo, existem poucos estudos sobre o desequilíbrio que os agentes antimicrobianos podem causar na comunidade microbiana em ambientes naturais.

2.3.1. Resistência aos antimicrobianos em ambientes naturais

A presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em diferentes ambientes aquáticos e terrestres vem sendo recentemente documentada. Bactérias que possuem resistência intrínseca a antimicrobianos são normalmente encontradas na natureza, contudo, esses organismos também podem adquirir genes de resistência adicionais de bactérias introduzidas no solo e na água (McArthur and Tuckfield, 2000; Ash et al, 2002).

O aumento da ocorrência da resistência antimicrobiana em bactérias provenientes de ambientes naturais como rios, lagos, sedimentos, solos (Ash et al, 2002; Díaz-Cruz et al; 2003; Schwartz et al; 2003) e as possíveis implicações para saúde pública têm levado a uma intensiva preocupação com o uso indiscriminado de antimicrobianos. O uso indiscriminado de antimicrobianos pode ocasionar certos problemas ambientais como a contaminação de recursos hídricos e o surgimento de microrganismos resistentes a essas drogas.

Os efluentes onde são continuamente despejados os resíduos oriundos de processos industriais e agropecuários, a produção natural de antibióticos por bactérias e fungos nativos de diversos ambientes, lixos e esgotos hospitalares e domésticos, excretas, varredura de antimicrobianos residuais e derramamentos acidentais gerados pela indústria consistem as principais vias de introdução e disseminação de antimicrobianos no ambiente (Witte, 2000, Teuber, 2001, Díaz-Cruz et al, 2003). Os antimicrobianos liberados no ambiente podem se acumular nos solos e sedimentos e conseqüentemente podem induzir efeitos adversos em organismos terrestres e aquáticos.

O uso dos lençóis d'água como receptores de efluentes orgânicos aumentaram com o crescimento populacional constante, agravando o problema das condições sanitárias em diversas comunidades humanas. As descargas dos efluentes orgânicos em águas naturais podem promover a eutrofização artificial, permitindo também a contaminação por microrganismos patogênicos, que são veículos de genes de resistência a diversos antimicrobianos (Parveen et al, 1997; Reinthaler *et al*, 2003; Constanzo *et al*, 2005). Dessa forma, os ambientes aquáticos naturais tornaram-se importantes sítios de contaminação humana por patógenos, que muitas vezes podem ser multiresistentes a diferentes antimicrobianos.

O papel do ambiente na emergência e disseminação de bactérias resistentes e seus possíveis caminhos, além da forma com que cada bactéria ambiental contribui para a disseminação dos genes de resistência ainda não é bem compreendido. Dessa forma, estudos recentes vêm sendo realizados para avaliar o impacto da utilização dos

antimicrobianos e a diversidade dos genes de resistência a essas drogas em populações bacterianas de ambientes naturais (Hagedorn et al., 1999; McArthur and Tuckfield, 2000; Aminov et al., 2001; Chee-Sanford et al., 2001; Nwosu, 2001; Zanetti et al., 2001; Costanzo et al., 2005). O estudo da resistência a antimicrobianos em uma comunidade bacteriana pode funcionar como importante indicador das mudanças sofridas em uma determinada comunidade amostrada em determinado ambiente (Edwards et al., 2001). Esses esforços são importantes para compreender a origem disseminação de resistência em ambientes naturais e assim desenvolver mecanismos para evitá-la, além de permitir uma análise de sua associação com a diversidade e dinâmicas bacterianas nesses ambientes.

A presença de bactérias resistentes em diferentes ambientes aquáticos vêm sendo continuamente relatada (Guardabassi et al, 1999; Ash et al, 2002; Lobo et al, 2002; Schwartz *et al*, 2003; Pruden et al, 2006). E os resultados desses estudos vêm sustentando algumas hipóteses como: 1) efluentes que levam resíduos de indústria farmacêuticas parecem causar mudanças na distribuição de certas bactérias pela seleção e/ou introdução de linhagens resistentes nesses ambientes (Guardabassi et al, 1999); 2) a poluição por metais pesados em ambientes aquáticos pode contribuir para o aumento da resistência a antimicrobianos por seleção indireta (McArthur and Tuckfield, 2000); 3) a caracterização de genes de resistência e de plasmídios deve fornecer informações sobre reservatórios de resistência aos antimicrobianos no ambiente (Ash et al, 2000); 4) genes de resistência estão presentes em concentrações maiores em compartimentos ambientais mais diretamente afetados por atividades humanas/agrícolas (Lobo et al, 2002; Pruden et al, 2006). 5) a dinâmica sazonal e geográfica parece ter influências na resistência ambiental (Lobo et al, 2002). Tudo isso, mostra a dimensão e complexidade do fenômeno da resistência e permite uma melhor compreensão da ecologia da resistência.

O monitoramento de populações bacterianas permanece sendo um problema intrigante na ecologia microbiana. Muitos esforços ainda devem ser realizados a cerca de um conhecimento científico mais significativo a respeito do desenvolvimento e dos efeitos da resistência antimicrobiana. É necessário determinar o destino dos antimicrobianos lançados no ambiente, determinar o impacto ambiental desses agentes em relação ao montante e duração de exposição, desenvolver modos de contenção dos antimicrobianos, determinar como esses agentes podem ser menos ativos ou completamente prevenidos em ambientes como aqueles destinados à distribuição de água, identificar práticas que poderiam limitar a disseminação da resistência bacteriana em hospitais, na agricultura e aquicultura, acessar o papel de substâncias antimicrobianas (que não sejam antibióticos) no desenvolvimento da

resistência, determinar os grupos de genes que determinam tanto resistência antimicrobiana como outros tipos de resistência, como genes de resistência a metais pesados e procurar novos mecanismos que possam estar envolvidos na disseminação da resistência. Além disso, é importante avaliar as relações entre a ecologia bacteriana e o desenvolvimento da resistência antimicrobiana, identificando as influências das práticas humanas, como a prática da agricultura, aquicultura, e processamento alimentar, no desenvolvimento da resistência ambiental e estabelecendo a contribuição das bactérias dos ambientes naturais no desenvolvimento da resistência clínica. Como mostrado muito ainda precisa ser feito para a compreensão e contenção do fenômeno da resistência.

Dentro do contexto aqui apresentado esta tese consiste de três capítulos que abordam, principalmente, a identificação de bactérias Gram-negativas de três lagos da Mata Atlântica e a resistência bacteriana nesses ambientes naturais, usando técnicas bioquímicas, fisiológicas (utilização de substratos de carbono) e moleculares, baseadas em sequências do gene de rRNA 16S e técnicas de *fingerprinting* do genoma bacteriano.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Considerando que: existem vários aspectos biológicos importantes dentre as bactérias presentes em ambientes naturais; que esses microrganismos movem-se facilmente entre os diversos ecossistemas humanos, animais e plantas para o solo e a água e vice-versa; que genes de resistência a antimicrobianos adquiridos por organismos em um ecossistema podem ser facilmente transferidos para organismos de outros ecossistemas;

que a presença de genes de resistência a antimicrobianos é um problema ecológico, socioeconômico e clínico, e ainda; que a Mata Atlântica é um dos mais importantes biomas em biodiversidade do mundo e que tem sido pouco estudado quanto a sua microbiota este estudo teve como objetivos identificar populações bacterianas Gram-negativas, e caracterizá-las quanto sua resistência aos antimicrobianos e a presença de genes de resistência a β -lactâmicos de três lagos oligotróficos do trecho médio da bacia do Rio Doce (Parque Estadual do Rio Doce, PERD – MG).

3.2. Específicos

- Proceder revisão da literatura envolvendo os métodos moleculares e sua vantagem para o estudo da diversidade bacteriana.
- Otimizar as técnicas de PCR para amplificação dos genes rRNA 16S e *bla*_{TEM1}.
- Identificar as bactérias isoladas dos três lagos oligotróficos do trecho médio da bacia do Rio Doce por técnicas de PCR envolvendo os genes de rRNA 16S.
- Analisar a diversidade entre as bactérias Gram-negativas isoladas e identificadas.
- Determinar a susceptibilidade dos isolados, estabelecendo as concentrações inibitórias mínimas para 10 antimicrobianos, incluindo o mercúrio.
- Detectar a presença do gene de resistência a β -lactâmicos, *bla*_{TEM1}, nas bactérias resistentes a ampicilina.
- Caracterização por testes bioquímicos e fisiológicos (utilização de diferentes substratos de carbono) e por diferentes métodos moleculares (16S rDNA, tDNA, ITS e ERIC PCR) dos isolados do complexo *Enterobacter cloacae*.

Capítulo 1

**Molecular approaches: advantages and artifacts in
assessing bacterial diversity**

Daniela Santos Pontes · Cláudia Iracema Lima-Bittencourt · Edmar
Chartone-Souza · Andréa Maria Amaral Nascimento

J Ind Microbiol Biotechnol. 2007 Jul;34(7):463-73

Capítulo 2

Molecular identification and analysis of antimicrobial resistance of bacteria isolated from oligotrophic lakes in a tropical region

Daniela Santos Pontes, Flaviane Alvarenga Pinheiro, Rafael Lucas Muniz Guedes, Cláudia Iracema Lima-Bittencourt, Edmar Chartone-Souza and Andréa Maria Amaral Nascimento

Abstract

A total of 272 indigenous bacteria isolated from natural and disturbed oligotrophic lakes were recovered on eosin methylene blue medium; they were characterized for antimicrobial resistance and identified taxonomically by homology search and phylogenetic comparisons. Based on phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequences, 97% of the isolates were found to be Gram-negative bacteria; they belonged to 11 genera, including *Enterobacter*, *Erwinia*, *Morganella*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Aquitalea* and *Chryseobacterium*. Overall, the composition of the communities in these lakes changed from year to year. Members of the genera *Acinetobacter*, *Enterobacter* and *Pseudomonas* predominated. Most of the bacteria were resistant to at least one antimicrobial. The incidence of resistance to β -lactams, chloramphenicol and mercury was high, whereas resistance to tetracycline, aminoglycosides and nalidixic acid was low. There was a great frequency of multiple resistances among the isolates from the three lakes. Most of the isolates resistant to ampicillin harbored the *bla*_{TEM1} gene, as revealed by PCR and sequencing. We suggest that the resistance profiles are dynamic and freshwater oligotrophic lakes can be a reservoir of resistant bacteria, which could be an important source of resistance genes spreading to other bacteria and possibly reaching human and animals.

Keywords: bacteria; ribosomal RNA gene; freshwater lake; antimicrobial resistance, *bla*_{TEM1} gene.

Introduction

The emergence and rapid dissemination of antimicrobial resistance among bacterial pathogens are responsible for the high frequency of failure to effectively treat infections worldwide; this is one of the major challenges for public health in the modern world. Furthermore, antimicrobial resistance has recently been recognized as a worldwide ecological problem (Levy, 1997; Levy, 2001; Summers, 2002). It is well documented that antimicrobial resistance is a direct consequence of antibiotic overuse and misuse in human and veterinary medicine, aquaculture and agriculture; this increasing selective pressure exerted on these bacteria can result in the propagation of resistant bacteria in diverse environments (Teuber, 2001; Díaz-Cruz *et al.*, 2003; Agerso & Sandvang, 2005). Antibiotic resistance can originate from gene mutations or by horizontal transfer between phylogenetically-diverse bacteria (White & Mcdermott, 2001; O'Brien, 2002). Besides, newly-acquired resistance genes may be maintained in new populations in the absence of antibiotic selection pressure (Alonso *et al.*, 2001). Bacterial antimicrobial resistance is an outcome of evolution and is a natural phenomenon, although it has been accelerated by several human related activities.

Overall, a high frequency of bacterial resistance to various antimicrobials is well documented in most clinical isolates (Hujer *et al.*, 2006; Lodise *et al.*, 2007). Moreover, this phenomenon has also been reported in wild animal populations and natural water samples (Gilliver *et al.*, 1999; Ash *et al.*, 2002; Lobova *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2003; Lima-Bittencourt *et al.*, 2007; Pontes *et al.*, 2007a). These studies demonstrate that resistance can also be maintained without antibiotic selective pressures; however, the extent to which these environmental factors affect resistance is not fully understood.

β -lactams are among the most frequently-used antimicrobials, and resistance to this class of agents is often observed (Livermore, 1995; Fluit *et al.*, 2001; Henriques *et al.*, 2006). β -lactamases, the enzymes that hydrolyze β -lactam antibiotics, are the main source of resistance to these drugs. Genes for β -lactamases may be found on chromosomes, plasmids, transposons and integrons (Weldhagen, 2004; Henriques *et al.*, 2006). TEM-1 β -lactamase gene is common among Gram-negative bacteria; it is one of the main causes of bacterial resistance to β -lactam antibiotics (Mabilat & Courvalin, 1990; Livermore, 1995; Fluit *et al.*, 2001).

Considering that lakes are important freshwater resources that are also responsible for transmission of antimicrobial resistant bacteria to humans (Witte, 2000; Ash *et al.*, 2002), and that few studies have focused on antimicrobial resistance in non-polluted aquatic

environments, we decided to evaluate natural and degraded oligotrophic lakes for culturable Gram-negative bacteria and determine their resistance to antimicrobial substances.

Materials and methods

Study area

We chose three lakes situated in the middle stretch of the Rio Doce basin. Two, Dom Helvécio and Gambazinho lakes, are located in a protected area (Parque Estadual do Rio Doce, PERD, 19°29'24"-19°48'18"S and 42°28'18"-42°38'30"W, Fig. 1); this park is an ecological reserve, composed of more than 50 lakes, and it contains the largest remnant of Atlantic Forest biome in Minas Gerais state, Brazil. The third lake, Jacaré, is located in the surroundings of the PERD. Dom Helvécio Lake is the deepest (32.5 m) and largest (6.87 km²) lake within the lake drainage area of Rio Doce basin, and is open to public for recreational activities. Gambazinho Lake (10.3 m; 0.1 km²) is much smaller and differently from Dom Helvécio Lake, is not open to tourists and consequently is a more preserved lake in the PERD. Jacaré Lake (9.8 m; 1.03 km²) is used as fishing club in a highly fragmented area of the Atlantic Forest.

Bacteria isolation

Two samplings efforts were carried out during the dry season in two different years (July 2003 and September 2005). Water samples (500 mL) were collected from a depth of 1 m at a central station in each lake. Bacteria were isolated by plating 100 µL of each water sample directly on eosin methylene blue agar plates (EMB, Difco). EMB culture medium is quite selective for Gram-negative bacteria (Laitinen *et al.*, 1992). The Petri plates were incubated at 30°C, for up to 48 hours. Two-hundred-seventy-two randomly-selected isolates were further streaked onto the surface of tryptone soy agar (Oxoid) and checked for purity, prior to subsequent molecular and phenotypic analyses. Subsequently, the isolates were stored in glycerol at -70°C.

Antimicrobial susceptibility testing

Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined by the agar dilution method in accordance with National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines (NCCLS, 2001), in Mueller-Hinton medium (MH; Difco). Ten antimicrobial agents were selected as representatives of the drugs commonly used in the treatment of human and animal infections caused by Gram-negative bacteria: ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, tetracycline, chloramphenicol, nalidixic acid, amikacin, gentamicin, kanamycin, streptomycin and the heavy metal, mercury bichloride. All antibiotics were obtained from the Sigma Chemical Co.

and mercury was obtained from the Merck Co. The data were interpreted according to MIC breakpoints, as recommended by the NCCLS or by the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) (Andrews, 2001; MacGowana & Wise, 2001; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001). In the absence of specific NCCLS and BSAC recommendations for some bacterial genera, the resistance breakpoints defined by NCCLS for *Enterobacteriaceae* were applied for *Aeromonas* spp (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003), and MIC breakpoints for non *Enterobacteriaceae* were applied for *Chryseobacterium* spp. and *Stenotrophomonas* spp. (Valdezate *et al.*, 2001; Kirby *et al.*, 2004). The susceptibility breakpoint for mercury bichloride was established as 4 µg/ml based on previous study (Nascimento *et al.*, 1999).

Multiple antibiotic resistance index

Multiple antibiotic resistance (MAR) index – defined as a/b , where a represents the number of antibiotics to which the isolate was resistant, and b represents the number of antibiotics to which the isolate was exposed – for each test isolate it was calculated as recommended by Kaspar *et al.* (1990).

DNA extraction

Genomic DNA was prepared from a loopful of cells grown for 18 h. The cell pellet was re-suspended in 500 µl of TE buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8; 0.001 M EDTA). The cells were lysed by addition of 30 µL of SDS 20% and 3 µL of Proteinase K (20 mg mL⁻¹). The DNA was purified as previously described (Dolzani *et al.*, 1994).

16S rRNA gene amplification

The complete 16S rRNA gene was amplified by touchdown PCR. Reactions were carried out with the conserved primers PA (5'-TCCTGGCTCAGATTGAACGC-3'), modified from Kuske *et al.* (1997), and with U2 (5'-ATCGGYTACCTTGTTACGACTTC-3'), as described by Lu *et al.* (2000), generating a 1,496 bp fragment. Polymerase chain reaction mixtures (20 µL) consisted of 0.4 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, 1U of *Taq* DNA polymerase (Phonutria, Minas Gerais, Brazil), and 40 ng of bacterial DNA. PCR was conducted with a Mini-cycler™ PTC-100 (MJ Research Inc. Waltham, MA) with an initial cycle of 10 min at 94°C, followed by 28 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing beginning at 53°C and ending at 45°C for 1 min, and extension at 72°C for 3 min. The annealing temperature was lowered 1°C every two cycles until it reached 45°C; this annealing temperature was maintained until the end of the cycling process. Cycles were finished by an elongation step of 10 min at 72°C.

Sequencing and phylogenetic analysis of 16S rDNA

The sequences of PCR products were automatically analyzed by using standard protocols with a DYEnamic ET dye terminator kit (Amersham Biosciences) and the MegaBACE 1000 capillary sequencer (Amersham Biosciences). The primers used for DNA sequencing were PA and E926R (5'-CCGICIATTIITTTIAGTTT-3'), corresponding to the 926 to 907 nucleotides position of the *E. coli* K12 16S rDNA gene (Kuske *et al.*, 1997; Watanable *et al.*, 2001). Each sequence was repeated at least three times in forward and reverse directions for every bacterial isolate. The 16S rRNA gene sequences were basecalled, checked for quality, aligned and analyzed using Phred v.0.20425 (Ewing & Green, 1998), Phrap v.0.990319 (Green, 1994) and Consed 12.0 (Gordon *et al.*, 1998) softwares.

The 16S rRNA gene sequences were assigned to the taxonomical hierarchy (proposed in release 6.0 of the nomenclatural taxonomy of Garrity and Lilburn by the CLASSIFIER function in the Ribosomal Database Project (RDP). Sequences were also compared against sequences held in RDP using SEQUENCE_SIMILARITY and against sequences held in GenBank using BLASTN, to search for similar homologous sequences of 16S rRNA gene partial sequences of our 272 isolates. Identification was defined as a 16S rRNA gene sequence similarity of >97% with that of a sequence deposited in the EMBL database (Drancourt *et al.*, 2000). The nucleotide sequences generated were deposited in the Genbank database with accession numbers XXX to XXX.

Bacterial community analysis

The Unifrac metric method (<http://bmf.colorado.edu/unifrac>) was used to compare bacterial communities from the different oligotrophic lakes (Lopuzone *et al.*, 2006). The phylogenetic tree was generated using the Neighbor Joining method with MEGA 3.1, using Kimura 2P distance measures. These data were used to compare bacterial communities, testing statistical differences among all samples, by using the unweighted pair group method (UPGMA) and principal coordinate analysis (PCA). Jackknifing was used to support UPGMA clustering results and significance tests were also performed, as previously described (Lozupone & Knight, 2005).

*bla*_{TEM1} gene amplification and sequencing

Isolates that had an MIC for ampicillin $\geq 16 \mu\text{g mL}^{-1}$, for *Pseudomonas* and *Acinetobacter* isolates, and $\geq 32 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *Enterobacteriaceae* and other isolates were screened for the *bla*_{TEM1} gene. Each isolate was subjected to PCR amplification using primers TEM_F (5'-AAAGATGCTGAAGATCA-3') and TEM_R (5'-TTTGGTATGGCTTCATTC-3') described by Speldooren *et al.* (1998). The *E. coli* C282 [*bla*_{TEM-1}] was used as a positive control (Brinas

et al., 2002). Reaction mixtures (20 μ L) contained 0.2 mM of each dNTP, 0.1 μ M of each primer, 1U of *Taq* DNA polymerase (Phoentria), and 40 ng of bacterial DNA. The temperature profile was as follows: initial cycle of 5 min at 94°C, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 42°C and 30 s, and extension at 72°C for 1 min 30 s, and a final cycle with an elongation step of 10 min at 72°C. PCR products were sequenced with dye terminators on an ABI automatic sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems) to confirm the specificity of the PCR. Primers previously used for amplification of each DNA fragment were used in the sequencing reactions. BLAST DNA homology searches were performed with the DNA database software of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Statistical analysis

Analysis of data was carried out with the SAS software package (SAS Institute, 1987) with a completely randomized analysis of variances for unequally replicated treatments ($P > 0.05$), with the MAR index values being transformed to the square root of the MAR index before analysis of variance. Duncan's test for unequally replicated means was used for further comparisons of means.

To correlate multiple resistance to the presence of the *bla*_{TEM1} gene the observations were classified simultaneously according to two attributes, the MAR index [low (0.3–0.6) and high (0.7–1.0)] and the occurrence of *bla*_{TEM1} gene [presence (+) or absence (–)]. The frequencies in the different categories were arranged in a two-way table (known as the 2 x 2 contingency table). Then, a Fisher exact probability was used as a test for systematic association of attributes (Steel & Torrie, 1980).

Results

Phylogenetic analysis

Bacteria identification was performed by partial 16S rRNA gene sequence analysis. The lengths of the partial sequences ranged from 468 to 882 nucleotides. A total of 272 bacterial isolates were analyzed, and more than 98% were identified to the genus level. Most of the identified bacteria (97%) were Gram-negative.

Sequence analysis revealed that several isolates had identical partial sequences. In these cases, only one of the identical sequences was considered for phylogenetic analysis (Figs. 2-7). The phylogenetic trees shown in Figs. 2-7 reflect the phylogenetic relationships of representative oligotrophic lakes isolates to their closest known relatives. Analysis of the bacterial isolates revealed a predominance of γ -Proteobacteria (89%), and they fell into nine genera: *Enterobacter*, *Erwinia*, *Morganella*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*,

Pseudomonas and *Stenotrophomonas* (Fig. 8). Among these, high relative abundance was detected for *Enterobacter* (Jacaré Lake, 2003 sampling), *Acinetobacter* (Jacaré and Dom Helvécio lakes, sampling 2005) and *Pseudomonas* (Gambazinho Lake, sampling 2005) (Fig. 8). The other bacterial isolates were β -Proteobacteria (0.5%), Flavobacteria (7.5%), Bacilli (2.5%) and Actinobacteria (0.5%). The specific genera found were *Aquitalea*, *Chryseobacterium*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* and *Arthrobacter* (Fig. 8). Bacteria belonging to the genera *Aquitalea*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Arthrobacter* and *Stenotrophomonas* were isolated in smaller proportions. Only five isolates fell into unclassified genera and were assigned to families of Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae. Among the 14 genera identified, *Acinetobacter*, *Enterobacter* and *Pseudomonas* constituted 74% of the isolates.

Comparison of bacterial genera in the communities

The distribution of bacterial genera differed considerably across the three lakes in the samples collected in 2003 and 2005. Gambazinho and Dom Helvécio lakes (sampling, 2003) had a considerably higher number of genera than found in Jacaré Lake (Fig. 8). In 2005 the three lakes had similar bacterial communities (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* and *Stenotrophomonas*), differing only in the number of isolates. This conclusion was based on the UPGMA tree and PCA, in which the isolates from the three lakes cluster together (Figs. 9-10); similarity among them was well supported by jackknife values ($P < 0.001$). The node that groups these isolates (N3, Fig. 9) was recovered 100% of the times (considering the small sample composed of 39 sequences). In PCA, the first principal component separates the bacterial communities isolated in 2005 from those isolated in 2003. Also, samples isolated in 2003 were more diverse, with more variation among them (Fig. 10). The highest similarity was observed between bacterial communities from Jacaré and Dom Helvécio lakes sampled in 2005, dominated by *Acinetobacter* isolates. Bacterial communities isolated from the three lakes in 2003 were significantly different from those isolated in 2005, as shown by Unifrac significance tests ($P \leq 0.05$). In general, the variation of the number of genera was higher between samples from the same lake at different years than between samples from different lakes.

The PCA was also useful to analyze the samples in environmental space, correlating the axes along which variation occurred with environmental variables, such as temperature or pH. The first two principal coordinates described 85% of the variation, suggesting that few independent factors were responsible for the variation between samples (Fig. 10).

Antimicrobial resistance analyses

The Gram-negative bacteria that were isolated from the three oligotrophic lakes in the two years (2003 and 2005) were characterized for their antibiotic-resistance phenotype. Resistance percentages were different among lakes and sampling periods within the same bacterial genus (Tables 1-3).

Bacteria isolates resistant to three or more of the antimicrobial agents were designated as multiple antimicrobial resistant (ranging from 3 to 10 antimicrobials) (Hujer et al., 2006); they were recovered from all samples at high percentages. The frequency of multiple antimicrobial resistant bacteria was seen for most of all isolates from all the three lakes: Jacaré Lake (76% in 2003 and 100% in 2005), Dom Helvécio Lake (62% in 2003 and 85% in 2005) and Gambazinho Lake (64% in 2003 and 77% in 2005), but these percentages were not statistically different between the years. Therefore, the index MAR was calculated for each lake in the two-year sample based on indexing (Kaspar *et al*, 1990). A significantly increase of MAR index was observed in 2005 in Gambazinho Lake (Fig. 11). The multi-resistance was maintained the same in Jacaré Lake and we observed a decreased in Dom Helvécio Lake. Therefore all lakes presented a high MAR index (≥ 0.4) in all sampling periods.

***Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Enterobacter* isolates**

Pseudomonas, *Acinetobacter* and *Enterobacter* isolates represented the majority of bacterial isolates retrieved from samples water. Two percent of these isolates were susceptible to all tested antimicrobial agents, 7 % were resistant to a single antimicrobial and 82% were multiple resistant. This high incidence of resistance was found in isolates from all lakes (Tables 1-4). The most common resistance phenotypes detected were to ampicillin (90%), amoxicillin- clavulanic acid (77%) and chloramphenicol (76%).

Pseudomonas isolates exhibited the highest MICs, and they had the highest antimicrobial resistance percentage to most of the antimicrobials (except for the aminoglycosides). *Pseudomonas* and *Acinetobacter* isolates presented the lowest MICs and the lowest percentage resistance to amikacin and gentamicin (Table 4). Otherwise, resistance to amikacin and gentamicin was higher for *Enterobacter* isolates; 90% of the isolates were at or below ≥ 128 and $64 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (Table 4).

A comparison of the antimicrobial resistance percentages in *Enterobacter* isolates from Jacaré and Dom Helvécio lakes versus Gambazinho Lake revealed that, for the antimicrobials ampicillin, amoxicillin- clavulanic acid, nalidixic acid and chloramphenicol, the resistance percentage was 7–71% lower in Gambazinho lake (Table 1). The largest

decreases were observed for ampicillin (71%) and amoxicillin-clavulanic acid (70%), in the comparison with Dom Helvécio lake (Table 1). Similar results were observed for *Acinetobacter* isolates from Jacaré and Dom Helvécio lakes compared to those from Gambazinho lake (Table 2).

Resistance to mercury was observed in all the genera, and it was generally associated with at least two other resistance markers. The highest percentage of mercury resistance was observed for *Pseudomonas* (78%), followed by *Enterobacter* (51%).

Resistance to multiple antimicrobials exhibited was variable among the isolates. The highest MAR index was seen for isolates from Dom Helvécio Lake in 2003 and from Gambazinho Lake in 2005.

Other Gram-negative bacteria

Other Gram-negative isolates, *Serratia*, *Moraxella*, *Stenotrophomonas*, *Erwinia*, *Aeromonas*, *Aquitalea*, *Morganella* and *Chryseobacterium*, were recovered from the three lakes in smaller numbers than were *Enterobacter*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas* isolates. For most of these isolates, with the exception of the Enterobacteria, no standard MIC breakpoints have been established.

Among Enterobacteria and *Aeromonas* isolates, the highest resistance percentages were detected against ampicillin, chloramphenicol and gentamicin (Table 4). Against *Chryseobacterium* isolates, almost all of the antimicrobials tested (except for nalidixic acid) seem to be active compounds, with high MIC₅₀ and MIC₉₀ values (Table 4). All *Stenotrophomonas* isolates were resistant to all of the aminoglycosides, with MIC₅₀ and MIC₉₀ at or below $\geq 128 \mu\text{g/ml}$ (Table 4).

Antibiotic resistance was different among the different genera. Seventy-one percent of these Gram-negative bacterial isolates were multiple resistant, and all *Stenotrophomonas* isolates displayed multiple resistance. More than 65% of these isolates were resistant to ampicillin, chloramphenicol, gentamicin and amikacin. Ninety-three percent of these bacteria, for which the breakpoint for ampicillin was not available, presented high MIC₅₀ values ($\geq 128 \mu\text{g mL}^{-1}$), suggesting resistance to this antibiotic (Table 4). Only one isolate of *Aquitalea* genus was obtained; it was susceptible to almost all antibiotics tested (low MICs), with the exception of the β -lactams.

Presence of the *bla*_{TEM} gene in the Gram-negative bacteria

Ampicillin-resistant bacteria were predominant, and we therefore considered it important to examine them for the *bla*_{TEM} gene. Two-hundred-thirty-two ampicillin-resistant Gram-negative isolates were screened for the *bla*_{TEM} gene. Partial DNA sequencing of the PCR-amplified

*bla*_{TEM} revealed that ampicillin-resistant isolates were strongly associated with the *bla*_{TEM} gene as well as to multiple antimicrobial resistance for Jacaré and Dom Helvecio lakes in the first year of sampling ($P < 0.001$). This gene was found in all the genera. Among the 165 isolates harboring the *bla*_{TEM} gene, there were 73 *Acinetobacter*, 40 *Enterobacter*, 24 *Pseudomonas*, 11 *Chryseobacterium*, 5 *Stenotrophomonas*, 4 *Erwinia*, 2 *Morganella*, 2 *Moraxella*, 1 *Aquitalea*, 1 *Serratia*, 1, *Aeromonas* and 1 representative from Pseudomonadaceae family.

Discussion

The bacterial communities originated from oligotrophic lakes that were under the same climatic and isothermal conditions during the sampling periods. Mixture of the water column, facilitated mainly by wind force (Petruccio *et al.*, 2006), promoted homogeneous distribution of organisms and nutrients along the column. Therefore our data should be representative of the entire water column.

Molecular analysis of 16S rRNA gene sequences is considered superior to conventional phenotypic identification methods and has been widely used to study environmental bacterial communities (Bowman *et al.*, 2000; Pontes *et al.*, 2007). Using this approach, it was possible to identify almost all bacteria isolated on EMB agar at the genus level. We could have used either MacConkey or EMB media for the isolation of Gram-negative bacteria, but MacConkey medium has more nutrients than EMB. Although our experimental design favored isolation of Gram-negative bacteria (97%), it allowed the isolation of some (3%) Gram-positive bacteria that were naturally present in the lakes, including *Arthrobacter*, *Staphylococcus* and *Lactobacillus* isolates. As expected, the isolation medium was highly selective for the recovery of Gram-negative bacteria (*Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Aquitalea*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Morganella*, *Serratia*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Chryseobacterium*). It is known that these bacteria are ubiquitous in the environment; although most studies on bacterial taxonomic distribution and antimicrobial resistance have been performed using strains of clinical origin (Clementino *et al.*, 2001; Levy, 2005; Ndip *et al.*, 2005).

It is known that the composition of bacterioplankton communities in lakes and oceans varies in time and space (Lobova *et al.*, 2002; Stabili & Cavallo, 2004). Significant differences were found in bacterial composition among the lakes studied in 2003, when compared to those observed in 2005, as shown by Unifrac analysis. Furthermore, bacterial composition demonstrated that most of the lakes have their own unique predominant bacteria, in contrast

with the samples collected from Gambazinho and Dom Helvécio lakes in 2003. The predominance of *Acinetobacter*, *Enterobacter* and *Pseudomonas* suggest that these bacteria may be important inhabitants in tropical lakes; they have also been reported in previous studies (Hazen, 1988; Ash *et al.*, 2002; Drucker & Panasyuk, 2006). Although *Aeromonas* is considered a waterborne bacterium (Goñi-Urriza *et al.*, 2000), it was found in small numbers. Most of the commensal bacteria that were isolated are pathogenic opportunists.

The impact of the dissemination of antimicrobial resistant bacteria and their resistance genes in natural aquatic environments has been of major concern (Alonso *et al.*, 2001; Kummerer, 2004). Many pathogens and commensals are common in aquatic environments. The emergence of bacterial resistance in aquatic environments can bring increased risk to human and animal health (Kummerer, 2004). A high frequency of Gram-negative resistant bacteria was detected in the three lakes; most of the isolates (98%) were resistant to at least one of the antimicrobials. Most of them demonstrated resistance to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid and chloramphenicol, and were more susceptible to aminoglycosides. Similar results have been reported for *Acinetobacter* spp. isolated from various aquatic sources (sewage, freshwater aquaculture and intestinal contents) by Guardabassi (1999). However, the percentage resistance that we observed was higher mainly for amoxicillin associated with clavulanic acid, a β -lactamase inhibitor. A predominance of ampicillin-resistant Gram-negative bacteria was also reported in rivers of the United States by Ash *et al.* (2002) and Enterobacteriaceae isolated from pristine freshwater (Lima-Bittencourt *et al.*, 2007). In contrast, Goñi-Urriza and coworkers reported much low frequencies of ampicillin resistant and multiple antimicrobial resistant bacteria found in an urban effluent (Goñi-Urriza *et al.*, 2000). Therefore, the present study has important implications for interpretation of results from freshwater lakes.

The other Gram-negative bacteria encountered in relatively small numbers (*Aeromonas*, *Aquitalea*, *Erwinia*, *Morganella*, *Serratia*, *Moraxella*, *Stenotrophomonas* and *Chryseobacterium*) also had high rates of resistance. All of them showed resistance or less susceptibility to the β -lactams (amoxicillin-clavulanic acid).

The MAR index is an excellent tool that permits to analyze the dissemination of bacteria resistance in a given population. A MAR index greater than 0.2 implies that the strains of such bacteria originate from an environment where several antibiotics could be detected. The MAR indices obtained in this study is a possible indication that a very large proportion of the bacterial isolates have been exposed to several antimicrobial substances. Multiple-antimicrobial resistance has been found to be common phenomenon among Gram-

negative bacteria (McKeon *et al.*, 1995; George, 1996; Miranda and Zemelman, 2002). We demonstrated frequent presence of multiple-resistant Gram-negative bacteria isolated from freshwater lakes and observed that Jacaré Lake, which is directly impacted by intermittent loads of untreated domestic sewage and by human and agricultural activity (cattle farming, fishing club, eucalyptus plantations), although it is also oligotrophic, exhibited the same MAR index in the two years. Interestingly, the two lakes located in the PERD exhibited the highest index of multiple resistance. Dom Helvécio Lake is open to tourists for recreational purposes and is less impacted by human activity than Jacaré Lake. The Dom Helvécio Lake presented the highest multiple resistance in 2003 and Gambazinho Lake, the most preserved one, presented the highest MAR index in 2005. The significantly high presence of multiple resistance in the three lakes in all years could be due to an increase of contaminants in each lake. This was also seen in 2006 by Pruden and coworkers who examined the frequency of antibiotic-resistance genes (ARGs); they found that the most-impacted environment had the highest incidence of ARGs (Pruden *et al.*, 2006). The selection and dissemination of antimicrobial resistant bacteria in natural environments is associated with indiscriminate use of antimicrobial in human and veterinary medicine, industrial and agricultural activities (Alonso *et al.*, 2001; Okeke & Edelman, 2001; Summers, 2002).

It is well established that most Gram-negative bacteria are resistant to β -lactams, due to β -lactamase production (Fluit *et al.*, 2001); molecular detection of the genes encoding these enzymes has been used to investigate the dissemination of resistance in clinical isolates (Mabilat & Courvalin, 1990; Fluit *et al.*, 2001). In view of the high percentage of bacteria resistant to β -lactams in our samples and the clinical importance of this class of antibiotics, we were prompted to analyze the occurrence of the *bla*_{TEM} gene among the different isolates. The *bla*_{TEM1} gene was detected in most of the isolates resistant to ampicillin recovered from our samples. The proportion of isolates in this collection of β -lactam-resistant bacteria carrying the *bla*_{TEM1} gene was comparable to that of other studies. We conclude that the *bla*_{TEM1} gene is widespread in environmental as well as in clinical isolates.

Finally, we suggest that freshwater oligotrophic lakes can be a reservoir of resistant bacteria and resistance genes. As lakes are important sources of water, directly or indirectly, for human and animal consumption, they may contribute to the maintenance and even the spread of bacteria with antimicrobial resistance.

Acknowledgements

We thank to FAPEMIG and CNPq for providing financial support. DSP and FRS were supported by CNPq.

References

- Agerso Y & Sandvang D (2005) Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in alcaligenes, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7941-7947.
- Alonso A, Sanchez P & Martinez JL (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* **3**: 1-9.
- Andrews J.M (2001) BSAC standardized disc susceptibility testing method. *J Antimicrob Chemother* **48**: 43-57.
- Ash RJ, Mauck B & Morgan M (2002) Antibiotic Resistance of Gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerg Infect Diseases* **8**: 713-716.
- Bowman JP, McCammon SA, Rea SM & McMeekin TA (2000) The microbial composition of three limnologically disparate hypersaline Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Lett* **183**: 81-88.
- Brinas L, Zarazaga M, Saenz Y, Ruiz-Larrea F & Torres C (2002) Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3156-3163.
- Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernandez-Rendon E, Aparicio GO, Guarro J & Chacon MR (2003) Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* **84**: 41-49.
- Clementino MM, de Filippis I, Nascimento CR, Branquinho R, Rocha CL & Martins OB (2001) PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter- and intraspecific relationships of *Enterobacter cloacae* strains. *J Clin Microbiol* **39**: 3865-3870.
- Díaz-Cruz MS, Alda MJL & Barceló D (2003) Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal Chem* **22**: 340-351.
- Dolzani L, Tonin E, Lagatolla C & Monti-Bragadin C (1994) Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23S intergenic spacer sequences. *FEMS Microbiol Lett* **119**: 167-174.
- Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP & Raoult D (2000) 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* **38**: 3623-3630.

- Drucker VV & Panasyuk EY (2006) Potentially pathogenic bacteria in a microbial community of Lake Baikal. *Hydrobiologia* **568**: 267-271.
- Ewing, B & Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**: 186-194.
- Fluit AC, Visser MR. & Schmitz FJ (2001) Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **14**: 836-871.
- George AM (1996) Multidrug resistance in enteric and other gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **139**: 1-10.
- Gilliver, MA, Bennett M, Begon M, Hazel SM. & Hart C.A (1999) Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature* **401**: 233-234.
- Goñi-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P & Quentin C (2000) Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol* **66**: 125-132.
- Gordon D, Abajian C & Green P (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**: 195-202.
- Green P (1994) PHRAP documentation. <http://www.phrap.org>.
- Guardabassi L, Dalsgaard A & Olsen JE (1999) Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *J Appl Microbiol* **87**: 659-667.
- Hazen TC (1988) Fecal coliforms as indicators in tropical waters: A review. *Toxic Assessment* **3**: 461-477.
- Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ & Correia A (2006) Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* **56**: 418-429.
- Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Thomson JM, Rather PN, Craft DW, Fishbain JT, Ewell AJ, Jacobs MR, Paterson DL & Bonomo RA (2006) Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 4114-4123.
- Kaspar CW, Burgess JL, Knight IT, & Colwell, RR (1990) Antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. *Can J Microbiol* **36**: 891-894.

- Kirby JT, Sader HS, Walsh TR & Jones RN (2004) Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Clin Microbiol* **42**: 445-448.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**: 150-163.
- Kummerer K (2004) Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother* **54**: 31-320.
- Kuske CR, Barns SM & Busch JD (1997) Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3614-3621.
- Laitinen S, Nevalainen A, Kotimaa M, Liesivuori J & Martikainen P (1992) Relationship between bacterial counts and endotoxin concentrations in the air of wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3774-3776.
- Levy S (1997) Antibiotic resistance: An ecological imbalance. In *Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. In *Ciba Foundation Symposium 207*. DJ Chadwick, J.G. (ed.): West Sussex, England: Wiley, Chichester.
- Levy SB (2001) Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clin Infect Dis* **33**: 124-129.
- Levy SB (2005) Antibiotic resistance-the problem intensifies. *Adv Drug Deliv Rev*. **57**: 1446-1450.
- Lima-Bittencourt CI, Cursino L, Gonçalves-Dornelas H, Pontes DS, Nardi RMD, Callisto M, Chartone-Souza E & Nascimento AMA (2007) Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater *Genet Mol Res* **6**: 510-521.
- Livermore DM (1995) Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**: 557-584.
- Lobova TI, Maksimova EY, Popova LY & Pechurkin NS (2002) Geographical and seasonal distribution of multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteria of Lake Shira. *Aquatic Ecol* **36**: 299-307.
- Lodise TP Jr, Lomaestro B & Drusano GL (2007) Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. *Clin Infect Dis* **44**: 357-363.

- Lozupone C & Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8228-8235.
- Lozupone C, Hamady M & Knight R (2006) UniFrac--an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics*. **7**: 371.
- Lu JJ, Perng CL, Lee SY & Wan CC (2000) Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **38**: 2076-2080.
- Mabilat C & Courvalin P (1990) Development of "olgotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM-lactamase in members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemoth* **34**: 2210-2216.
- MacGowana AP & Wise R (2001) Establishing MIC breakpoints and the interpretation of in vitro susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother* **1**: 17-28.
- McKeon DM, Calabrese JP & Bissonnette GK (1995) Antibiotic resistant gram negative bacteria in rural groundwater supplies. *Wat Res* **29**: 1902-1908.
- Miranda CD & Zemelman R (2002) Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Sci Total Environ* **293**: 207-218.
- Nascimento AMA & Chartone-Souza E (1999) Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res* **2**: 92-101.
- Nascimento AMA, Cursino L, Gonçalves-Dornelas H, Reis A, Chartone-Souza E & Marini MA (2003) Antibiotic-Resistant Gram-negative bacteria in birds from the Brazilian Atlantic forest *The Condor* **105**:358–361.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 2001 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, AsM.-AWNCfC (2001) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Aproved standard M7-A5.*: Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Ndip RN, Dlonga HM, Ndip LM, Akoachere JF & Nkuo Akenji T (2005) *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from clinical and environmental samples in Buea, Cameroon: current status on biotyping and antibiogram. *Trop Med Int Health* **10**: 74-81.
- O'Brien TF (2002) Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Diseases* **34**: 78-84.

- Okeke IN & Edelman R (2001) Dissemination of antibiotic-resistant bacteria across geographic borders. *Clin Infect Dis* **33**: 364-369.
- Petrucio MM, Barbosa FAR & Furtado, ALS (2006) Bacterioplankton and phytoplankton production in seven lakes in the middle Rio Doce basin, south-east Brazil. *Limnologica* **36**: 192-203.
- Pontes DS, Lima-Bittencourt, CI, Chartone-Souza E & Nascimento, AMA (2007a) Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**: 463-473.
- Pontes DS, Lima-Bittencourt, CI, Azevedo MSP, Chartone-Souza E & Nascimento AMA. (2007b) Phenotypic and genetic analysis of *Enterobacter* spp. from a Brazilian oligotrophic freshwater lake. *J Can Microbiol* **53**: 983-991.
- Pruden A, Pei R, Storteboom H & Carlson KH (2006) Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environ Sci Technol* **40**: 7445-7450.
- SAS Institute (1987) SAS/STAT guide for personal computers, version 6. SAS Institute, Cary, N.C.
- Speldooren V, Heym B, Labia R & Nicolas-Chanoine MH (1998) Discriminatory detection of inhibitor-resistant beta-lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 879-884.
- Stabili L & Cavallo, RA (2004) Biodiversity of culturable heterotrophic bacteria in the southern adriatic sea Italian coastal waters. *Sci Mar* **68**: 31-41.
- Steel RGD & Torrie JH (1980) Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. McGraw-Hill, Toronto, Ontario, Canada.
- Summers AO (2002) Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clin. Infect. Diseases* **34**: 85-92.
- Teuber M (2001) Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* **4**: 493-499.
- Valdezate S, Vindel A, Loza E, Baquero F & Cantón R (2001) Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1581-1584.
- Watanabe K, Kodama Y & Harayama S (2001) Design and evaluation of PCR primers to amplify 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J Microbiol Methods* **44**: 253-262.

Weldhagen GF (2004) Integrons and beta-lactamases-a novel perspective o resistance. *Int J Antimicrob Agents* **23**: 556-562.

White DG & Mcdermott PF (2001) Emergence and transfer of antibacterial resistance *J Dairy Sci* **84**: 151-155.

Witte W (2000) Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *J Antimicrob Agents* **14**: 321-325.

Table 1 Antimicrobial resistance and multiple resistance percentage in *Enterobacter* isolates sampled during the dry season from Jacaré, Gambazinho and Dom Helvécio lakes in Brazil

Antimicrobials	Breakpoint	Range	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
			% Resistance (number of isolates)							
			Jacaré Lake		Gambazinho Lake		Dom Helvécio Lake		Total	
		S1 (44)	S2 (2)	S1 (9)	S2 (8)	S1 (1)	S2 (7)	S1 (54)	S2 (17)	
Ap	32	2-512	86	100	56	0	100	100	81	52
Am	32	2-512	68	100	33	0	100	86	61	47
Nx	32	2-128	32	100	33	0	100	14	33	18
Cm	32	2-128	61	100	33	0	100	57	59	35
Tc	16	2-128	9	50	33	0	0	0	11	6
Gm	16	2-128	30	0	44	0	100	0	33	0
Ak	64	2-128	20	50	33	0	100	0	22	6
Km	64	2-128	20	0	56	0	100	0	30	0
Sm ^a	64	2-128	55	50	33	0	100	0	52	6
Hg ^b	4	2-16	39	100	89	100	0	0	48	59
Total			95	100	89	100	100	100	94	100
Multiple resistance			77	100	78	0	100	42	78	29

Ap, ampicillin; Am, amoxicillin-clavulanic acid; Nx, nalidixic acid; Cm, chloramphenicol; Tc, tetracycline, Gm, gentamicin; Ak, amikacin; Km, kanamycin; Sm, streptomycin and Hg, mercury. S1, sampling in July 2003; S2, sampling in September 2005.

^a The susceptibility breakpoint for streptomycin was established as 64 $\mu\text{g/L}$, based on a previous study (Chiew *et al*, 1998)

^b The susceptibility breakpoint for mercury bichloride was established as 4 $\mu\text{g/L}$, based on a previous study (Nascimento *et al*, 2003)

Table 2 Antimicrobial resistance and multiple resistance percentage in *Acinetobacter* isolates sampled during the dry season from Jacaré, Gambazinho and Dom Helvécio lakes in Brazil

Antimicrobials	Breakpoint	Range	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)							
			% Resistance (number of isolates)							
			Jacaré Lake		Gambazinho Lake		Dom Helvécio Lake		Total	
		S1 (1)	S2 (38)	S1 (13)	S2 (2)	S1 (3)	S2 (36)	S1 (17)	S2 (76)	
Ap ^a	16	2-512	100	100	77	100	100	100	88	100
Am ^a	16	2-512	100	100	8	50	100	92	29	95
Nx	NA	2-128	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cm	32	2-128	0	97	46	50	67	92	41	93
Tc	16	2-128	0	11	8	50	0	6	6	9
Gm	16	2-128	0	13	0	0	33	6	12	10
Ak	64	2-128	0	0	15	0	33	6	18	3
Km	NA	2-128	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sm	NA	2-128	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hg ^b	4	2-16	100	55	100	100	33	14	88	37
Total			100	100	100	100	100	100	100	100
Multiple resistance			0	100	54	50	33	92	47	95

Ap, ampicillin; Am, amoxicillin-clavulanic acid; Nx, nalidixic acid; Cm, chloramphenicol; Tc, tetracycline, Gm, gentamicin; Ak, amikacin; Km, kanamycin; Sm, streptomycin and Hg, mercury. NA, not available breakpoints based on NCLLS or BSAC criteria. ND, not determined. S1, sampling in July 2003; S2, sampling in September 2005.

^aThe susceptibility breakpoints for Ap and Am were established by BSAC (Andrews, 2001).

^b The susceptibility breakpoints for mercury bichloride was established as 4 $\mu\text{g/L}$, based on a previous study (Nascimento *et al*, 2003).

Table 3 Antimicrobial resistance and multiple resistance percentage in *Pseudomonas* isolates sampled during the dry season from Jacaré, Gambazinho and Dom Helvécio lakes

Antimicrobials	Breakpoint	Range	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
			% Resistance (number of isolates)							
			Jacaré Lake		Gambazinho Lake		Dom Helvécio Lake		Total	
		S1 (0)	S2 (4)	S1 (1)	S2 (27)	S1 (0)	S2 (4)	S1 (1)	S2 (35)	
Ap ^a	16	2-512		100	100	100	-	100	100	100
Am ^a	16	2-512	-	100	100	100	-	75	100	97
Nx ^a	32	2-128	-	100	100	100	-	75	100	97
Cm	32	2-128	-	100	100	100	-	100	100	100
Tc	16	2-128	-	25	0	78	-	0	0	63
Gm	16	2-128	-	50	100	4	-	25	100	9
Ak	64	2-128	-	25	0	0	-	0	0	3
Km	NA	2-128	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
Sm	NA	2-128	-	ND		ND	-	ND	ND	ND
Hg ^b	4	2-16	-	100	100	78	-	50	100	77
Total			-	100	100	100		100	100	100
Multiple resistance				100	100	100		100	100	100

Ap, ampicillin; Am, amoxicillin-clavulanic acid; Nx, nalidixic acid; Cm, chloramphenicol; Tc, tetracycline, Gm, gentamicin; Ak, amikacin; Km, kanamycin; Sm, streptomycin and Hg, mercury; NA, not available breakpoints based on NCLLS or BSAC criteria; NR, not-recovered; ND, not determined. S1, sampling in July 2003; S2, sampling in September 2005.

^aThe susceptibility breakpoints for Ap and Am were established by BSAC (Andrews, 2001).

^bThe susceptibility breakpoints for mercury bichloride was established as 4 $\mu\text{g/L}$, based on a previous study (Nascimento *et al*, 2003).

Table 4 Antimicrobial resistance of antimicrobials against all isolates from Jacaré, Dom Helvécio and Gambazinho lakes

Genera (n)	% Resistant isolates (MIC ₅₀ , MIC ₉₀ - □g/ml)									
	Ap	Am	Nx	Tc	Cm	Gm	Ak	Km	Sm	Hg
<i>Acinetobacter</i> ^a (93)	98 (256, ≥ 512)	83 (32, 128)	NA (16, 64)	9 (4, 8)	84 (128, ≥128)	11 (≤2, 16)	5 (4,16)	ND (8,32)	ND (32,128)	46 (≤2,16)
<i>Enterobacter</i> (71)	75 (256, ≥512)	58 (64, 256)	30 (8,64)	10 (≤2, 16)	54 (32, 128)	25 (≤2, 64)	18 (4,≥128)	23 (8,≥128)	41 (32,≥128)	51 (4,8)
<i>Pseudomonas</i> ^a (36)	100 (≥ 512, ≥512)	97 (≥ 512, ≥ 512)	97 (128, 128)	61 (16, 16)	100 (≥128,≥128)	11 (≤2, 8)	3 (≤2,8)	ND (4,8)	ND (32,128)	78 (4,16)
<i>Chryseobacterium</i> (20)	NA (128,512)	NA (32,256)	NA (8,32)	60 (16,64)	70 (64,128)	75 (128, ≥128)	75 (≥128,128)	NA (≥128,≥128)	NA (128, ≥128)	(4,16)
<i>Erwinia</i> (9)	56 (32, 512)	22 (16,64)	89 (128,≥128)	22 (≤2,8)	67 (128,128)	89 (≥128,≥128)	56 (128,128)	44 (32,128)	33 (32,64)	11 (≤2,8)
<i>Aeromonas</i> (9)	78 (512, ≥512)	44 (64,512)	56 (32,32)	22 (≤2,64)	67 (128,≥128)	56 (16,≥128)	44 (16,128)	67 (128,≥128)	ND (64,≥128)	44% (4,8)
<i>Stenotrophomonas</i> (8)	NA (≥512,≥512)	NA (128,256)	NA (64,128)	88% (32,32)	75% (32,64)	100% (≥128,≥128)	100% (≥128,≥128)	ND (≥128,≥128)	ND (≥128,≥128)	88 (4,4)
<i>Morganella</i> (6)	100 (≥512, ≥512)	50 (16, 256)	50 (8, 64)	0 (≤2, 8)	67 (4, 128)	50 (≤2, 128)	50 (16, 128)	50 (32, ≥128)	50 (32, ≥128)	33% (≤2, 4)
<i>Moraxella</i> ^b (4)	50 (≤2, 128)	25% (≤2,32)	NA (8, 32)	NA (≤2, ≤2)	100% (32, 128)	50% (≤2, 4)	25% (≤2, 64)	NA (≤2, 64)	NA (≤2,128)	100 (4,8)
<i>Serratia</i> (2)	50 (≤2, ≥512)	0 (4,8)	50 (≤2, 64)	50 (≤2, 16)	50 (≤2, 64)	0 (≤2, ≤2)	0 (≤2, 4)	0 (≤2, 8)	50 (≤2,128)	100% (4,4)
<i>Aquitalea</i> (1)	ND (256)	ND (32)	ND (16)	ND (≤2)	ND (16)	ND (4)	ND (16)	ND (8)	ND (16)	ND (8)

The degree of resistance in the population overall is given by the minimum inhibitory concentration for 50% and 90% of isolates (MIC₅₀ and MIC₉₀). Antimicrobials: Ap, ampicillin; Am, amoxicillin-clavulanic acid; Km, kanamycin; Ak, amikacin; Gm, gentamicin; Sm, streptomycin; Tc, tetracycline; Cm, chloramphenicol; Nx, nalidixic acid; and Hg, mercury; ND, not determined.

^a The susceptibility breakpoints for Ap, Am and Nx were established by BSAC (Andrews, 2001; MacGowana & Wise, 2001).

^b BSAC MIC breakpoints for *Moraxella catarrhalis* (MacGowana & Wise, 2001).

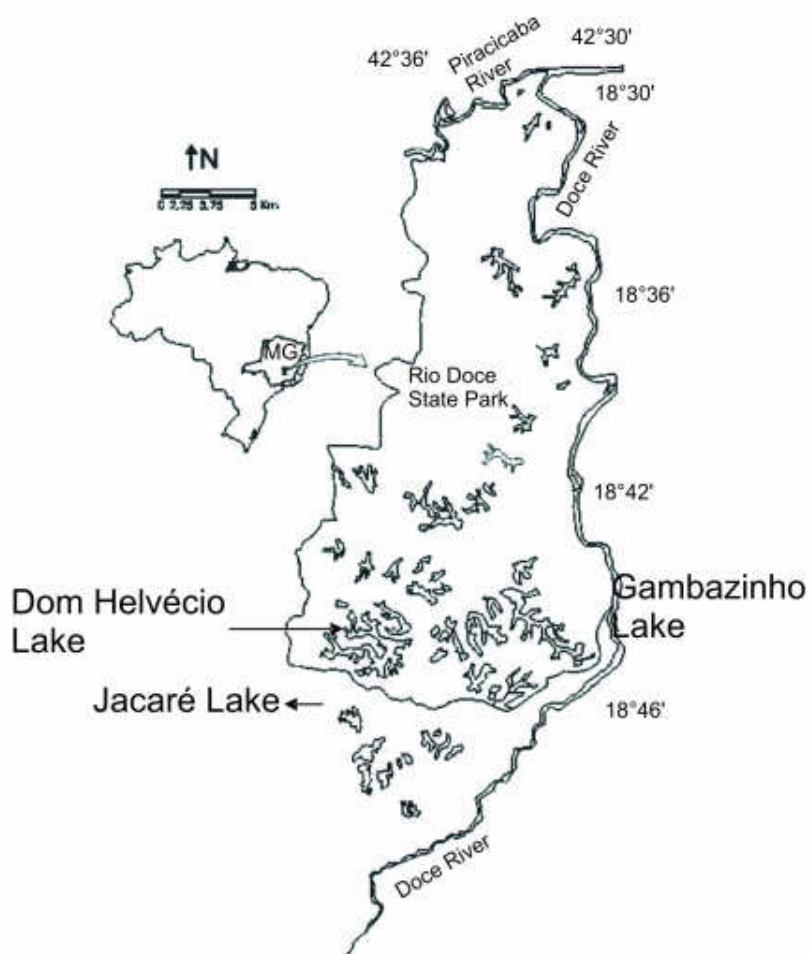


Figure 1. Rio Doce State Park and sampling site locations 1: Jacaré Lake; 2: Dom Helvécio Lake and 3: Gambazinho Lake.

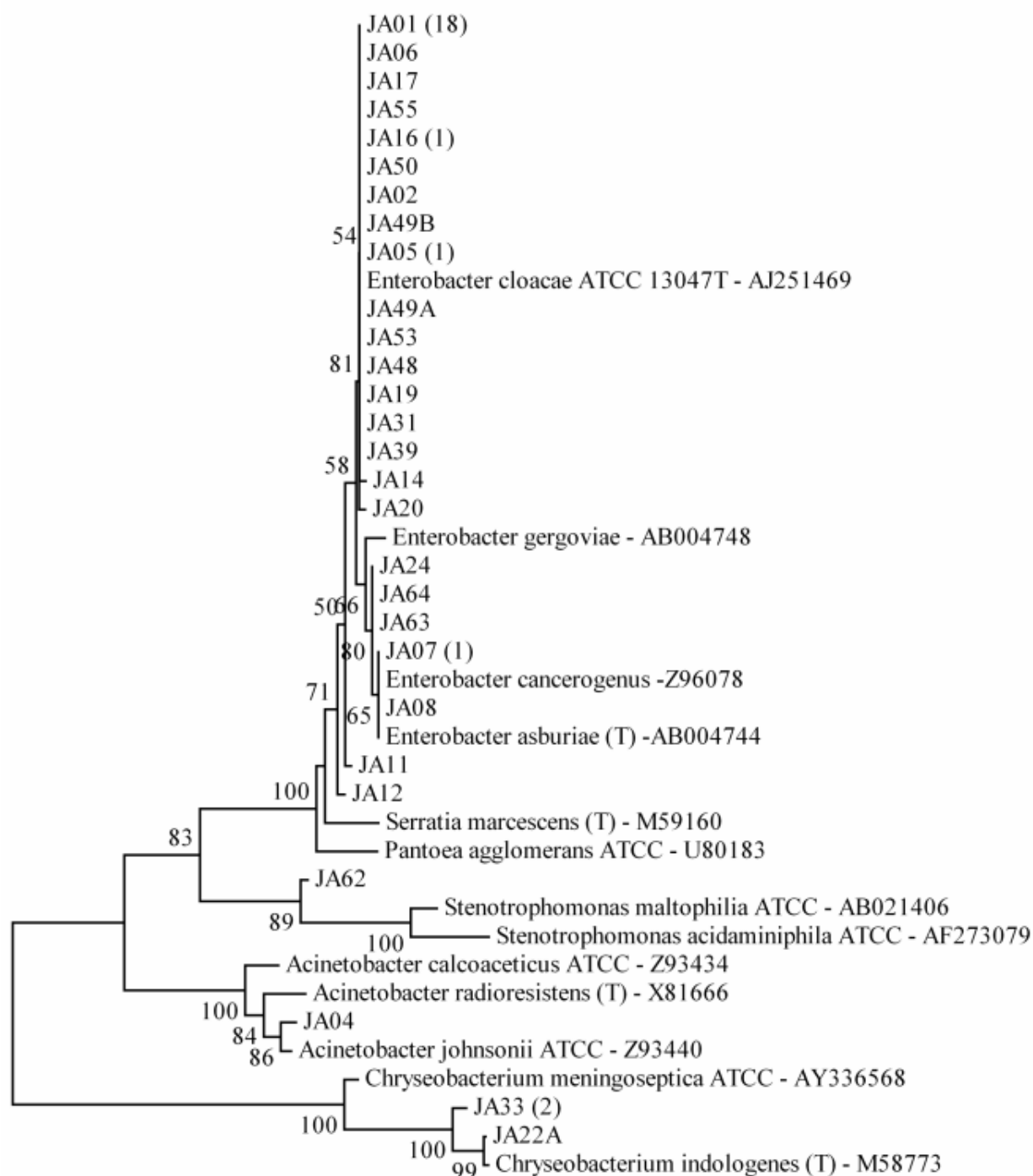


Figure 2. Neighbor-joining tree of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Jacaré Lake in 2003. Isolates with names beginning with JA were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap steps were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences.

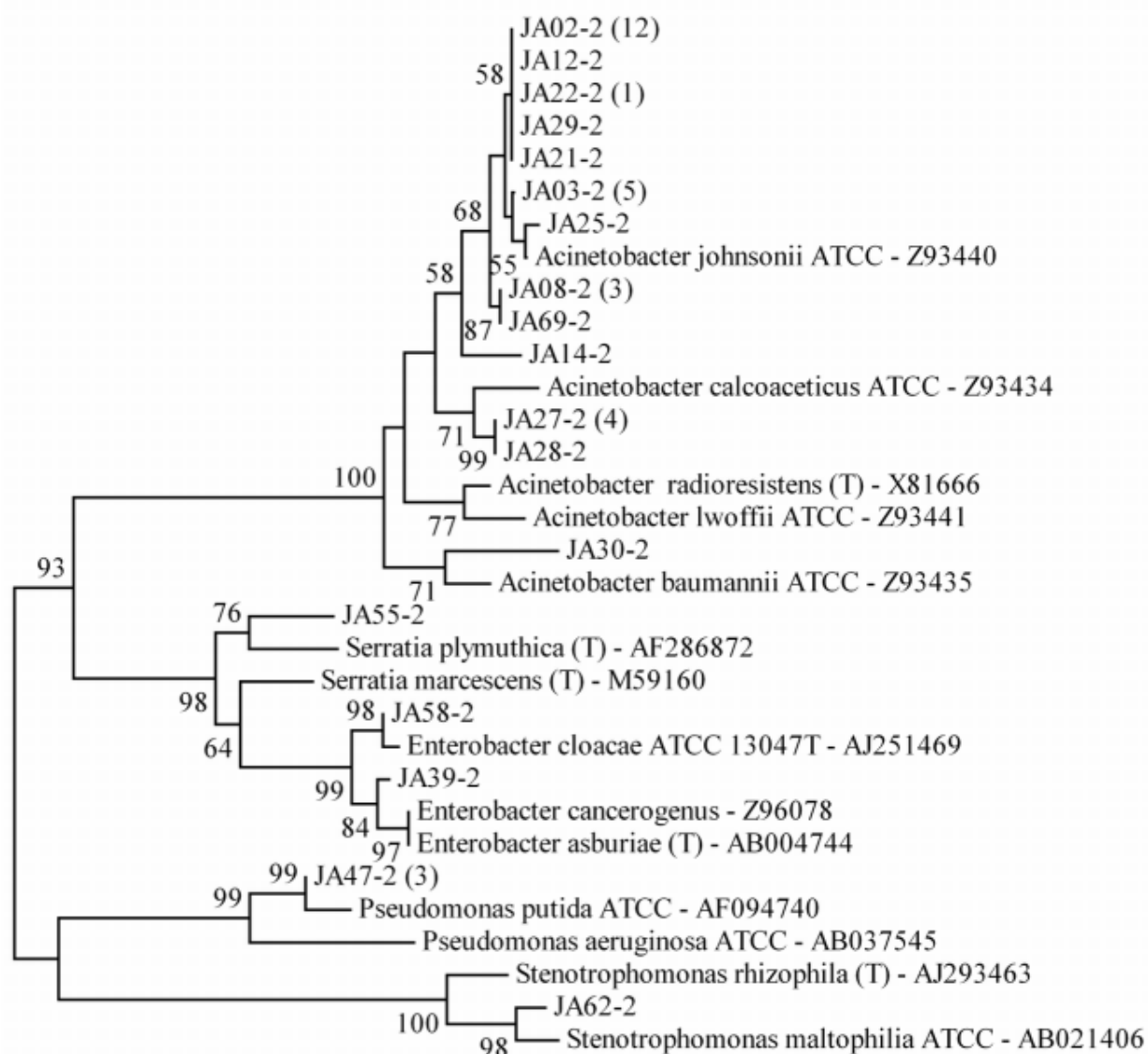


Figure 3. Neighbor-joining tree of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Jacaré Lake in 2005. Isolates with names beginning with JA were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap steps were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences.

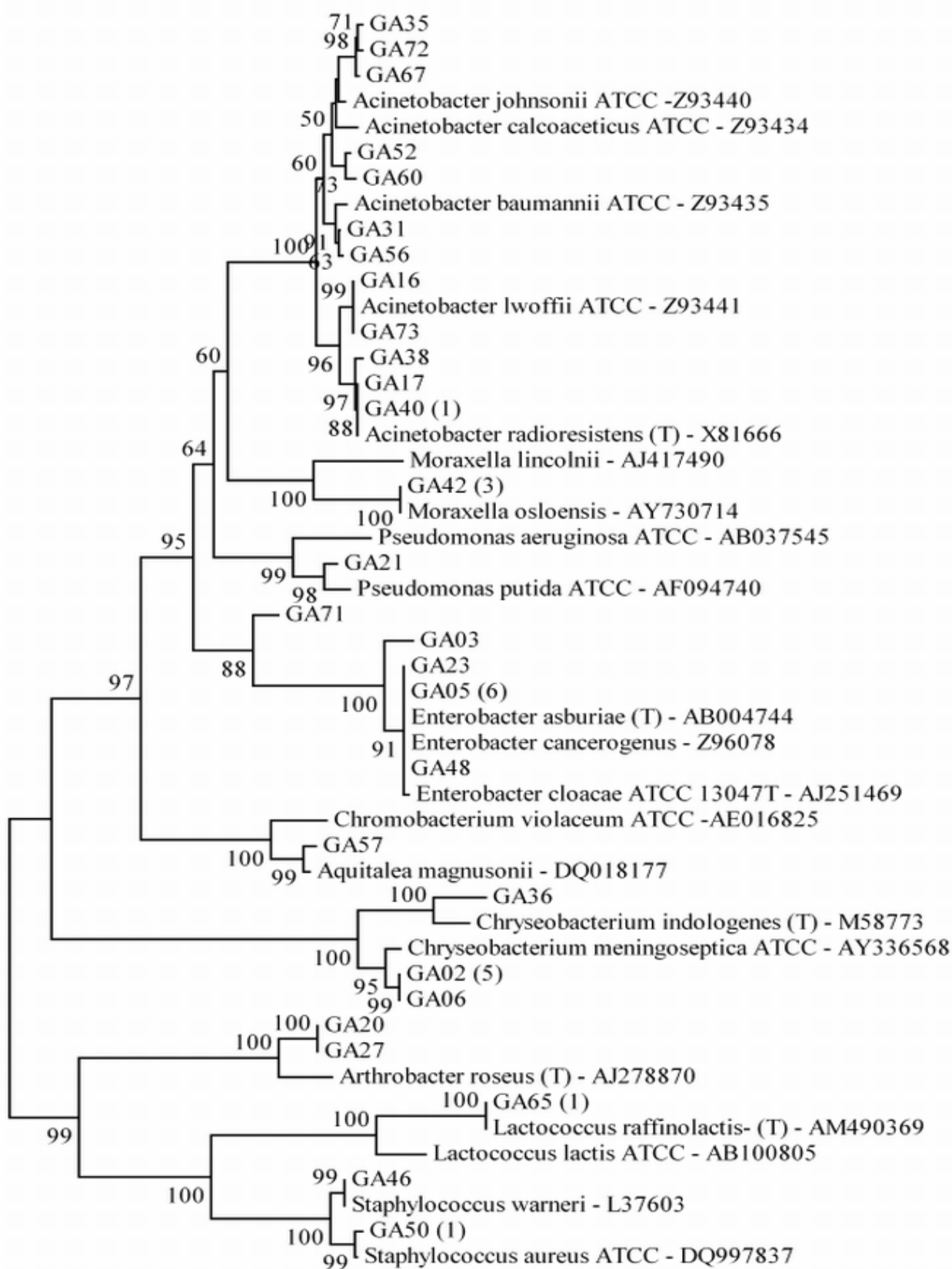


Figure 4. Neighbor-joining tree of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Gambazinho Lake in 2003. Isolates with names beginning with JA were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap steps were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences.

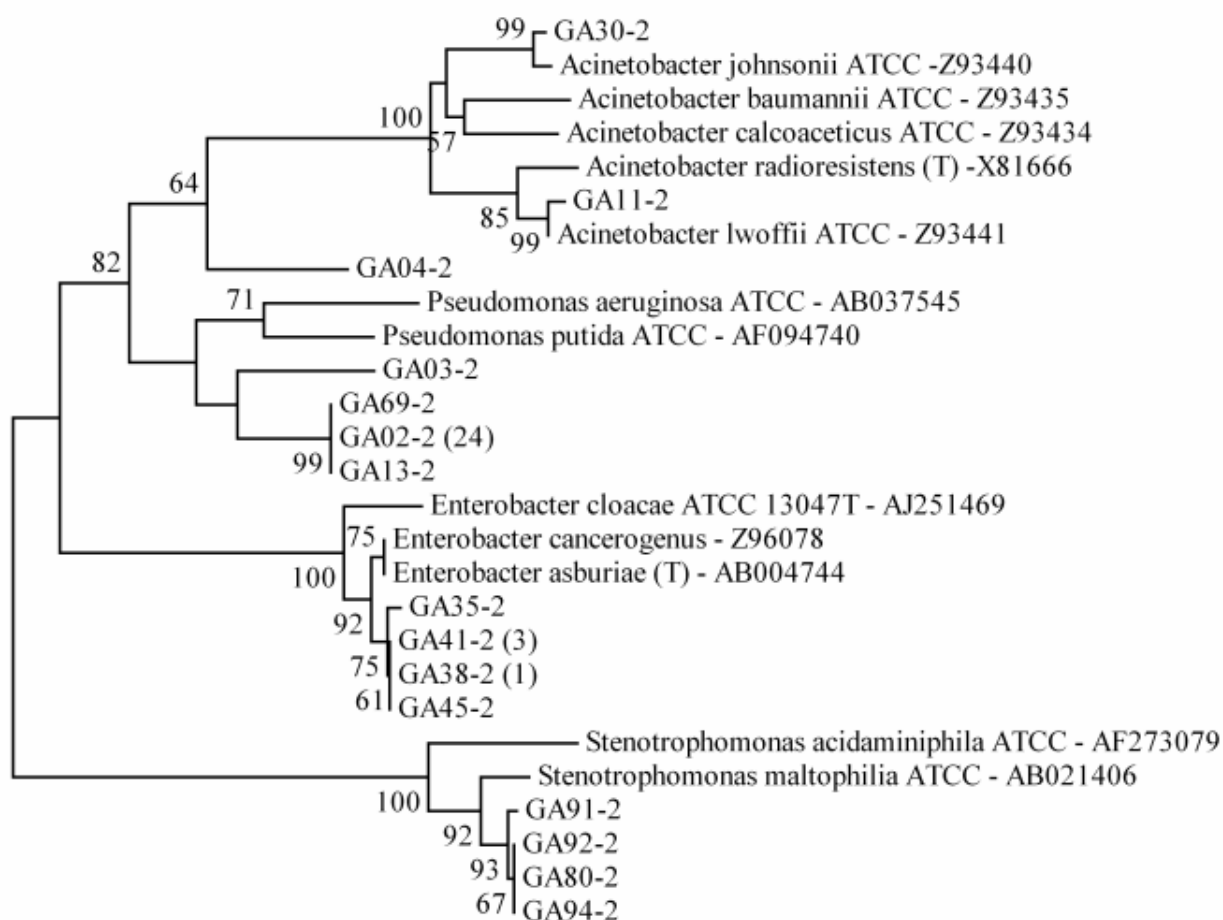


Figure 5. Neighbor-joining tree of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Gambazinho Lake in 2005. Isolates with names beginning with JA were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap steps were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences.

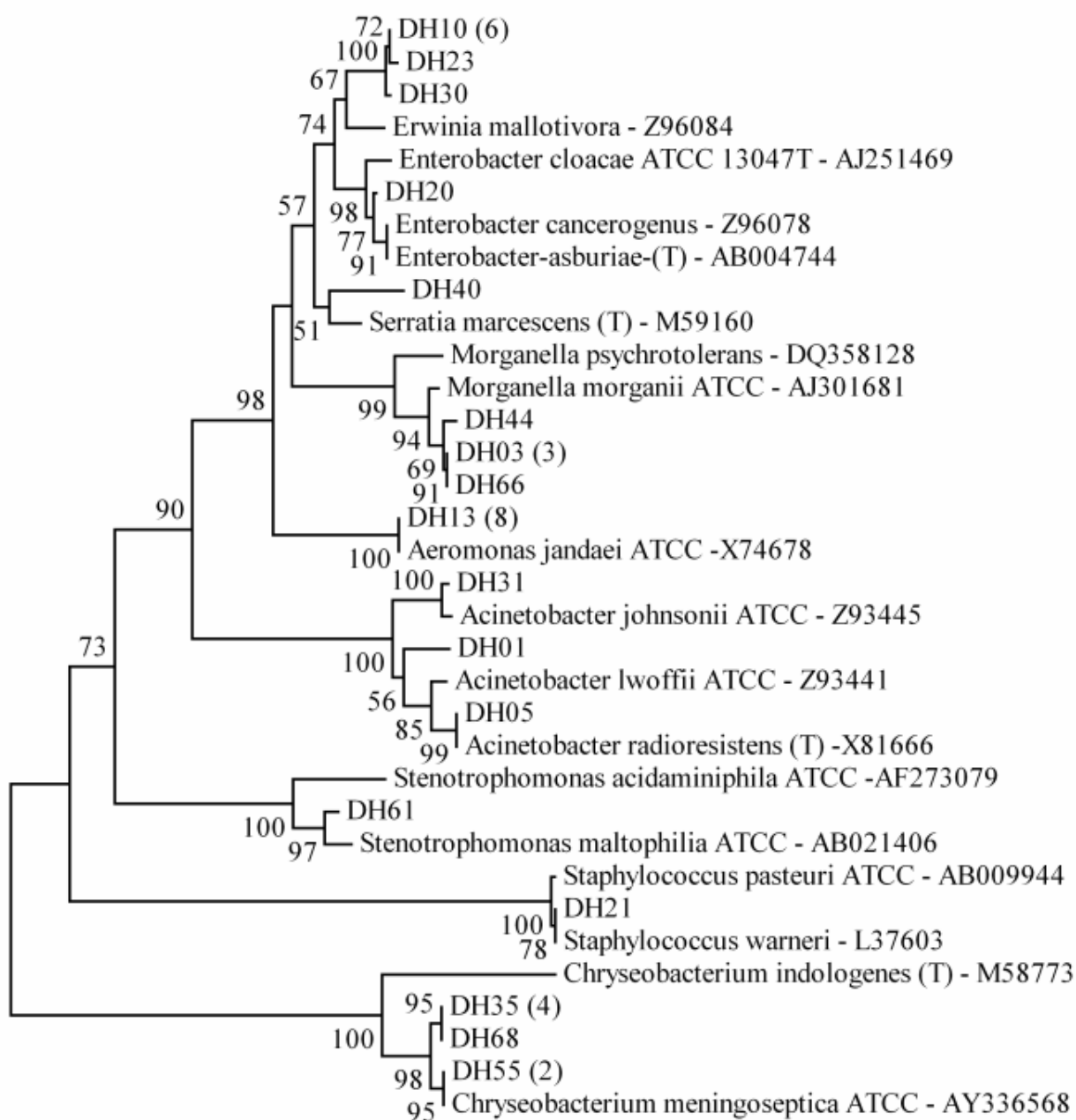


Figure 6. Neighbor-joining tree of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Dom Helvécio Lake in 2003. Isolates with names beginning with JA were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap steps were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences.

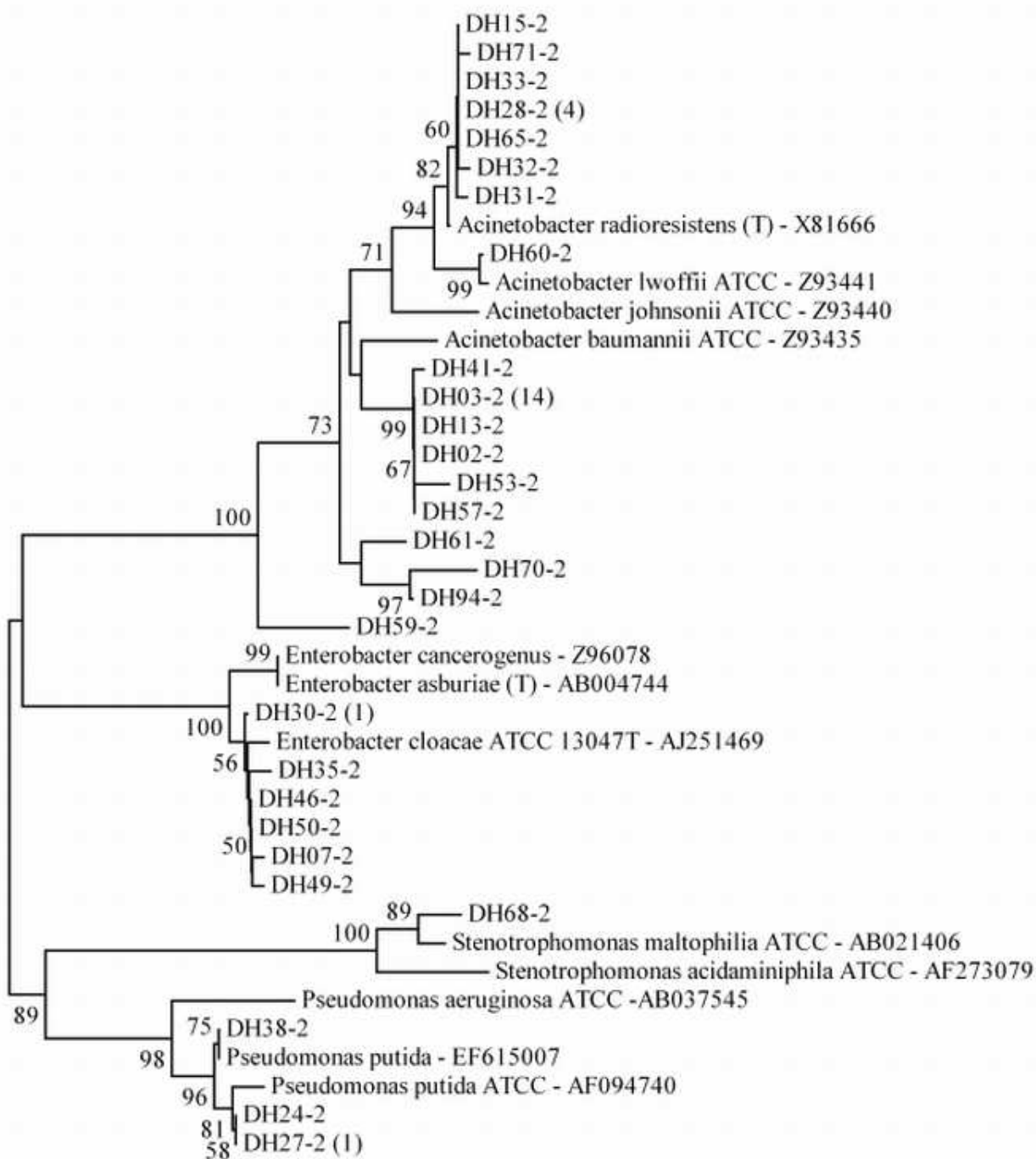


Figure 7. Neighbor-joining tree of partial DNA sequences of the 16S rRNA gene of isolates recovered from Dom Helvécio Lake in 2005. Isolates with names beginning with JA were evaluated in this study and the other species of bacteria were retrieved from GenBank. One-thousand bootstrap steps were used to evaluate the robustness of the inferred trees. Numbers in parentheses correspond to the number of isolates with identical sequences.

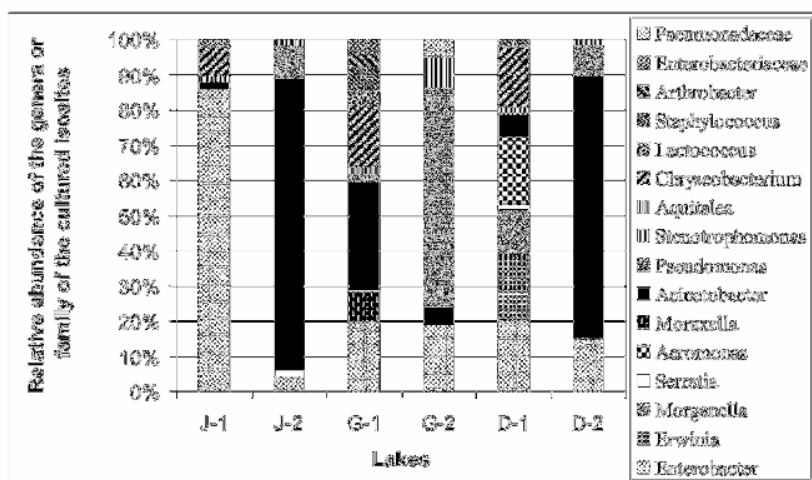


Figure 8. Relative abundance of taxonomic groups in oligotrophic lakes based on analyses of the 16S rRNA gene.

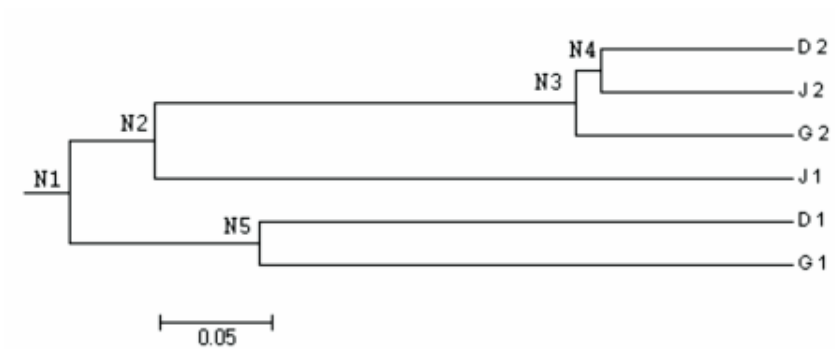


Figure 9. UPGMA cluster of isolates from Jacaré (J), Dom Helvécio (D) and Gambazinho(G) lakes in July 2003 (1) and September 2005 (2).

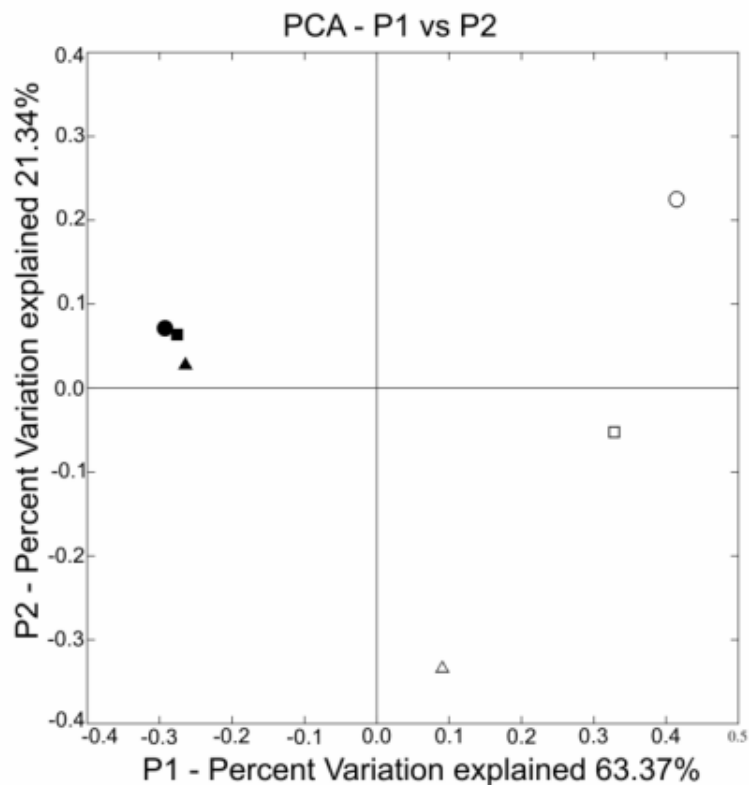


Figure 10. Principal component analysis ordination plot for the 16S rRNA gene. The percent variation explained by each principal component is indicated on the axis labels. Lakes are represented by the following symbols: Dom Helvécio ■, Gambazinho ●, and Jacaré ▲. Closed symbols represent samples collected in July 2003 and open symbols represent samples collected in September 2005.

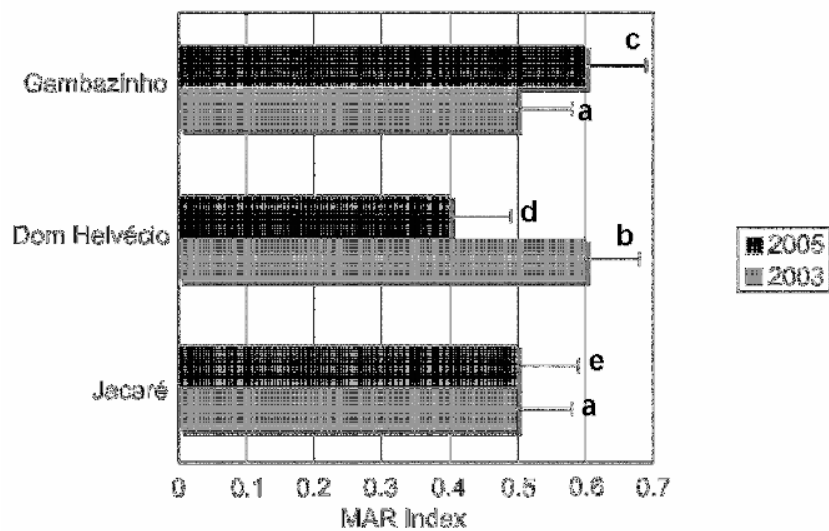


Figure 11. MAR index average. Means between lake categories within a year with the same letter are not significantly different by Duncan's test ($P < 0.05$).

Capítulo 3

Phenotypic and genetic analysis of *Enterobacter* spp. from a Brazilian oligotrophic freshwater lake

Daniela Santos Pontes, Claudia Iracema Lima-Bittencourt, Marcela
Santiago Pacheco Azevedo, Edmar Chartone-Souza and Andrea Maria
Amaral Nascimento

Can J Microbiol. 2007 Aug;53(8):983-91.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foram identificadas bactérias Gram-negativas isoladas de três lagos oligotróficos do trecho médio da bacia do Rio Doce (PERD, MG) e analisada a susceptibilidade das mesmas a diversos antimicrobianos utilizados na área clínica, e ao mercúrio. É notório que todas as bactérias recuperadas dos três lagos são ubíquas na natureza, contudo a maioria dos estudos realizados de identificação e distribuição taxonômica das bactérias e a análise da resistência bacteriana aos antimicrobianos preferencialmente focalizam linhagens bacterianas de importância clínica.

Um total de 272 bactérias foi isolado dos lagos Jacaré, Dom Helvécio e Gambazinho em 2003 e 2005, sendo 97% delas bactérias Gram-negativas. Os resultados das análises são condizentes com a metodologia que foi utilizada para o isolamento bacteriano, para o qual foi usado o meio EMB, que seleciona predominantemente bactérias Gram-negativas.

Comunidades de bactérias Gram-negativas foram identificadas por meio da análise de sequências parciais do gene rRNA 16S e classificadas na sua maioria no nível de gênero. Dentre elas, predominaram os isolados dos gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*. Bactérias dos gêneros *Morganella*, *Erwinia*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Stenotrophomonas*, *Aquitalea* e *Chryseobacterium* também foram isoladas, mas em menor número.

As comunidades isoladas dos lagos Jacaré, Dom Helvécio e Gambazinho no ano de 2003 mostraram-se distintas entre si, diferentemente do que foi observado no ano de 2005, cujas comunidades dos três lagos eram compostas basicamente por isolados dos gêneros *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*.

A amplificação e sequenciamento parciais do gene de rRNA 16S mostrou ser uma técnica prática e rápida para a identificação e maior conhecimento de comunidades bacterianas encontradas nesses lagos. Contudo, essa técnica possui suas limitações, pois apesar da

identificação baseada nas sequências do gene de rRNA 16S ser de grande importância ainda existem alguns problemas que devem ser solucionados, incluindo a alta similaridade nucleotídica das sequências desse gene entre diferentes espécies bacterianas e a variação entre sequências de diferentes linhagens bacterianas dentro da mesma espécie, como é o caso dos gêneros *Enterobacter* e *Acinetobacter*.

Uma população de linhagens do gênero *Enterobacter* isolada do lago Jacaré em 2003 foi analisada por diferentes técnicas fenotípicas e moleculares. A identificação desses isolados mostrou a limitação da técnica molecular baseada nas sequências do gene de rRNA 16S. A abordagem polifásica utilizada no estudo da população de *Enterobacter* foi de extrema relevância para identificação e caracterização detalhada das espécies de *Enterobacter* recuperadas do lago. A amplificação de regiões entre os genes de tRNA permitiu a diferenciação e a identificação dos isolados da espécie *E. cloacae*. As técnicas de amplificação das regiões intergênicas e ERIC (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*) têm sido usadas para a caracterização clonal de diferentes espécies de enterobactérias e para o estudo da relação genética entre isolados e revelaram neste estudo que as linhagens de *E. cloacae* identificadas não possuem uma diversidade genética intra-específica. Essas técnicas mostraram potencialidade para avaliação da variação genética em nível de espécie.

Os *E. cloacae* isolados apresentaram diferentes perfis fisiológicos e de resistência aos antimicrobianos, apesar de apresentarem-se geneticamente idênticos, considerando o perfil apresentados por ITS, ERIC e tDNA-PCR, reforçando a importância do uso de ferramentas moleculares na análise taxonômica de linhagens bacterianas.

Diante do problema causado pela resistência e da raridade de dados sobre a genética e evolução desse fenômeno bacteriano na natureza, torna-se indispensável avaliar o problema analisando outras bactérias, que não as patogênicas, que fazem parte de ecossistemas naturais. A grande maioria das bactérias isoladas nos três lagos é resistente a pelo menos um antibiótico. A incidência de bactérias resistentes à ampicilina, amoxicilina-ácido clavulâmico,

cloranfenicol e ao mercúrio foi alta, seguida pela resistência ao ácido nalidíxico. As menores frequências de resistência foram observadas para os aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, estreptomicina e kanamicina) e para tetraciclina. A maioria dos isolados resistentes à ampicilina possuía o gene *bla_{TEM1}*, como mostrado pelas técnicas de PCR e sequenciamento.

A alta incidência de bactérias isoladas dos lagos da bacia do Rio Doce com perfil de resistência, principalmente contra β -lactâmicos, demonstra que deve ser comum o fenômeno da multirresistência nas comunidades bacterianas naturais, sugerindo a manutenção de genes de resistência nesses ambientes. O Lago Jacaré, localizado fora do PERD, funciona como clube de pesca e recebe descargas consideráveis de esgotos domésticos e industriais, em sua maioria, sem qualquer tratamento prévio; o lago Dom Helvécio encontra-se dentro do PERD e os visitantes podem usufruir de suas águas para fins recreacionais; e o lago Gambazinho parece ser a um dos lagos mais protegidos do PERD, sendo recentes os estudos nesse lago. Coincidentemente, o lago Jacaré apresentou o maior índice de bactérias multirresistentes, seguido pelos lagos Dom Helvécio e Gambazinho, estes dois últimos localizados dentro do PERD e, conseqüentemente, mais preservados. A presença de bactérias resistentes nesses lagos pode ser resultado de diferentes fatores como: resistência intrínseca, presença de microrganismos produtores e outras fontes de antibióticos, contaminação das águas por excreções dos animais presentes na região, escoamentos das águas de origens industrial e agrícola, provenientes essencialmente, de certos produtos utilizados, como adubos e inseticidas, bem como invasões ao redor das reservas e desmatamentos.

5. CONCLUSÕES

Portanto, pelas análises bioquímica, fisiológica e molecular, por meio do gene rRNA16S, foram encontradas bactérias de diversos gêneros bacterianos, com predominância de *Acinetobacter*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*. Outros oito gêneros de bactérias Gram negativas foram identificadas. A partir das análises do rRNA 16S, tDNA, ITS e *fingerprinting*, detectou-se baixa diversidade dentre os isolados de *E. cloaceae*.

Esse estudo sugere que os perfis de resistência encontrados são dinâmicos e que a presença de bactérias multirresistentes, nos ambientes naturais estudados, assim como a presença do gene de resistência *bla*_{TEM1}, podem ser o resultado, dentre outros, de atividades antropogênicas. Além disso, ele contribui para uma possível mudança de paradigma na discussão acerca da origem e evolução do fenômeno da resistência, principalmente da resistência às penicilinas, incluindo os ambientes naturais, ao lado dos hospitais e outros ambientes reconhecidos como de alta pressão seletiva.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, A., Sanchez, P. and Martinez, J. L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* **3**, 1-9.

Aminov, R. I., Garrigues-Jeanjean, N. and Mackie, R. I. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol* **67**, 22-32.

Arber, W. (2000). Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 1-7.

Baker, G. C., Smith, J. J. and Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* **55**, 541-55.

Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* **14**, 933-51, table of contents.

Bruins, M. R., Kapil, S. and Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* **45**, 198-207.

Bryson, V. and Szybalski, W. (1952). Microbial selection. *Science* **115**, 45-51.

Chartone-Souza, E. (1998). Bactérias ultra-resistentes: uma guerra quase perdida. *Ciência Hoje* **23**, 26-35.

Chee-Sanford, J. C., Aminov, R. I., Krapac, I. J., Garrigues-Jeanjean, N. and Mackie, R. I. (2001). Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1494-502.

Conly, J. A. r. i. C. C.-. (2002). Antimicrobial resistance in Canadá. *CMAJ* **167**, 885-891.

Costanzo, S. D., Murby, J. and Bates, J. E. r. t. a. e. t. a. e. M. P. B.-. (2005). Ecosystem response to antibiotic entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin* **51**, 218-223.

- Dahllof, I.** (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 213-7.
- Davison, J.** (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**, 73-91.
- Díaz-Cruz, M. S., Alda, M. J. L. d. and Barceló, D.** (2003). Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal Chem* **22**, 340-351.
- Dobrindt, U. and Hacker, J.** (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 550-7.
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A. and Kuske, C. R.** (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1662-9.
- Edwards, M. L., Lilley, A. K., Timms-Wilson, T. H., Thompson, I. P. and Cooper, I.** (2001). Characterisation of the culturable heterotrophic bacterial community in a small eutrophic lake (Priest Pot). *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 295-304.
- Ewing, B. and Green, P.** (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**, 186-194.
- Fluit, A. C., Visser, M. R. and Schmitz, F.-J.** (2001). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* **14**, 836-871.
- Fry, J.** (2000). Bacterial diversity and 'unculturables'. *Microbiol Today* **27**, 186-188.
- Goñi-Urriza, M., Capdepuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P. and Quentin, C.** (2000). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol* **66**, 125-32.
- Gordon, D., Abajian, C. and Green, P.** (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**, 195-202.

Hagedorn, C., Robinson, S. L., Filtz, J. R., Grubbs, S. M., Angier, T. A. and Reneau, R. B., Jr. (1999). Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5522-31.

Heritage, J., Ransome, N., Chambers, P. A. and Wilcox, M. H. (2001). A comparison of culture and PCR to determine the prevalence of ampicillin-resistant bacteria in the faecal flora of general practice patients. *J Antimicrob Chemother* **48**, 287-9.

Huang, W., Petrosino, J., Hirsch, M., Shenkin, P. S. and Palzkill, T. (1996). Amino acid sequence determinants of beta-lactamase structure and activity. *J Mol Biol* **258**, 688-703.

Hugenholtz, P., Goebel, B. M. and Pace, N. R. (1998a). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**, 4765-74.

Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. and Pace, N. R. (1998b). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* **180**, 366-76.

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L. and Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci Total Environ* **346**, 87-98.

Jaspers, E., Nauhaus, K., Cypionka, H. and Overmann, J. (2001). Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiol Ecol* **36**, 153-164.

Kellenberger, E. (1994). Genetic ecology: a new interdisciplinary science, fundamental for evolution, biodiversity and biosafety evaluations. *Experientia* **50**, 429-37.

Keller, M. and Zengler, K. (2004). Tapping into microbial diversity. *Nat Rev Microbiol* **2**, 141-150.

Kemp, P. F. and Aller, J. Y. (2004). Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiol Ecol* **47**, 161-177.

Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W. and Bohannon, B. J. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature* **418**, 171-4.

Kolár, M., Urbánek, K. and Tomás, L. (2001). Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents* **17**, 357-363.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**, 150-63.

Kurland, C. G., Canback, B. and Berg, O. G. (2003). Horizontal gene transfer: a critical view. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9658-62.

Kuske, C. R., Barns, S. M. and Busch, J. D. (1997). Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3614-3621.

Lawrence, J. G. (1999). Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr Opin Microbiol* **2**, 519-23.

Levin, B. R. and Bergstrom, C. T. (2000). Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proc Nat Acad Sci U S A* **97**, 6981-5.

Levy, S. (1997). Antibiotic resistance: An ecological imbalance. In Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. In *Ciba Foundation Symposium 207*, (ed. J. G. DJ Chadwick): West Sussex, England: Wiley, Chichester.

Levy, S. B. (2002). The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **49**, 25-30.

Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J. L. and Garabetian, F. (2005). Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Res* **39**, 380-8.

Mabilat, C. and Courvalin, P. (1990). Development of "olgotyping" for Characterization and Molecular epidemiology of TEM -lactamase in members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemoth* **34**, 2210-2216.

McArthur, J. V. and Tuckfield, R. (2000). Spatial patterns in antibiotic resistance among Stream bacteria: effects of industrial pollution. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3722-3726.

McInerney, J. O., Wernecke, M., Mullarkey, M. and Powell, R. (2002). Bacteria and Archaea: Molecular techniques reveal astonishing novel diversity. *Biodiversity* **3**, 3-10.

Nascimento, A. M. and Chartone-Souza, E. (2003). Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res* **2**, 92-101.

Nee, S. (2003). Unveiling prokaryotic diversity. *Trends Ecol Evolut* **18**, 62-63.

Nwosu, V. C. (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Res Microbiol* **152**, 421-430.

O'Brien, T. F. (2002). Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Diseases* **34**, 78-84.

Okeke, I. N. and Edelman, R. (2001). Dissemination of antibiotic-resistant bacteria across geographic borders. *Clin Infect Dis* **33**, 364-9.

Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-40.

Petrucio, M. M., Barbosa, F. A. R. and Furtado, A. L. S. (2006). Bacterioplankton and phytoplankton production in seven lakes in the Middle Rio Doce basin, south-east Brazil. *Limnologica* **36**, 192-203.

Reinthalder, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wust, G., Haas, D., Ruckenbauer, G., Mascher, F. and Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge. *Water Res* **37**, 1685-90.

Rodriguez-Valera, F. (2002). Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environ Microbiol* **4**, 628-33.

Rodriguez-Valera, F. (2004). Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol Lett* **231**, 153-8.

Rossello-Mora, R. and Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 39-67.

Rowe-Magnus, D. A. and Mazel, D. (1999). Resistance gene capture. *Curr Opin Microbiol* **2**, 483-8.

Schleifer, K. H. (2004). Microbial diversity: facts, problems and prospects. *Syst Appl Microbiol* **27**, 3-9.

Summers, A. O. (2002). Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clin. Infect. Diseases* **34**, 85-92.

Tenaillon, O., Taddei, F., Radmian, M. and Matic, I. (2001). Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res Microbiol* **152**, 11-6.

Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance.. *Curr Opin Microbiol* **4**, 493:499.

Torsvik, V., Ovreas, L. and Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**, 1064-6.

Ward, D. M., Weller, R. and Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**, 63-5.

White, D. G. and Mcdermott, P. F. (2001). Emergence and transfer of antibacterial Resistance. *J Dairy Sci* **84**, 151-155.

Witte, W. (2000). Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *J Antimicrob Agents* **14**, 321-325.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-71.

Zanetti, S., Spanu, T., Deriu, A., Romano, L., Sechi, L. A. and Fadda, G. (2001). In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *Int J Antimicrob Agents* **17**, 407-9.

ANEXOS

7.1. METODOLOGIA COMPLEMENTAR

7.1.1. Área de estudo

Os estudos foram realizados em três lagoas pertencentes à área do trecho médio da Bacia do Rio Doce, em Minas Gerais: Lagoas Dom Helvécio e Gambazinho, situados no Parque Estadual do Rio Doce (PERD) e a Lagoa Jacaré situada nas áreas de reflorestamento entorno do parque. O PERD (19°29'24"-19°48'18"S e 42°28'18"-42°38'30"O) é uma estação ecológica e constitui o maior remanescente do bioma Mata Atlântica (Floresta Tropical Úmida) no estado de Minas Gerais. A área do trecho médio da Bacia do Rio Doce é cercada por floresta de eucaliptos, que atende à indústria siderúrgica e à demanda de celulose, sendo o restante dessas áreas constituídas por pastagens, áreas de agricultura diversificada e áreas de mineração. Essas práticas constituem importantes fatores de impacto aos ecossistemas aquáticos da região, provocando níveis consideráveis de poluição e contaminação das águas, que recebem descargas consideráveis de esgotos domésticos e industriais, em sua maioria, sem qualquer tratamento prévio.

A Lagoa Dom Helvécio é a lagoa com maior profundidade (32 m) e extensão (687 ha) do sistema lacustre do trecho médio do Rio Doce. A Lagoa Gambazinho é uma das menores (10 há) e com menor profundidade (10,3 m), sendo também considerada uma das áreas mais protegidas do PERD. Ambas foram classificadas como sendo lagoas oligotróficas. Já a Lagoa Jacaré, situada fora do PERD, é utilizada como clube de pesca e pode apresentar diferentes condições de trofia.

7.1.2. Amostras de água e isolamento bacteriano

As amostras de água foram coletadas utilizando-se uma garrafa de van Dorn, na profundidade de 1 m das lagoas, em uma estação fixa da região limnética. A água foi colocada em frascos de vidro esterilizados e armazenadas em gelo, por até seis horas, até serem transportadas ao laboratório (Chee-Sanford *et al.*, 2001). Alíquotas de 100 µl da água coletada foram semeadas em placas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), favorecendo a seleção das bactérias Gram-negativas, e incubadas a 25°C por 24 horas. Posteriormente, foram selecionados 10 isolados (colônias) bacterianos de cada uma das 10 placas semeadas com amostras da água de cada uma das três lagoas em estudo para estocagem.

7.1.3. Estocagem

Os isolados bacterianos selecionados foram semeados em Caldo Nutriente (CN), incubados por 24 horas, a 25°C. Em seguida, uma alíquota de cada cultura foi misturada com glicerol em uma concentração final de 15%. As amostras foram nomeadas e estocadas em duplicatas em *ultrafreezer* a -70°C.

7.1.4. Processamento e análise filogenética das seqüências

As seqüências parciais de rDNA 16S geradas foram processadas pelo pacote que contém os programas Phred/ Phrap/ Consed, em sistema operacional Linux, para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20), alinhamento e edição das seqüências para geração de uma seqüência consenso de alta qualidade para cada isolado bacteriano (Ewing and Green, 1998; Gordon et al., 1998).

Em seguida as seqüências geradas foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank do NCBI (National Center of Biotechnology Information) e no Ribosomal Database Project II (RDP) para análise de similaridade. Para classificação dos isolados em nível de gênero, foi utilizado o programa *Classifier* do RDP II.

Para o alinhamento das seqüências obtidas, foram e serão usados os programas CLUSTAL W e MEGA 3 (Kumar et al., 2004). Árvores filogenéticas foram e serão construídas por *neighbor-joining* com o programa MEGA. Critérios filogenéticos foram adotados para averiguação da identidade taxonômica dos isolados, quando comparados às amostras já presentes em bancos de dados do GenBank.

O programa UniFrac foi utilizado para comparar as comunidades bacterianas isoladas em 2003 e 2005 usando a informação filogenética. Os resultados foram gerados a partir das árvores filogenéticas construídas pelo programa MEGA3, contendo as sequências do gene rRNA 16S, derivadas das comunidades bacterianas isoladas dos três lagos (Jacaré, Dom Helvécio e Gambazinho) em dois anos diferentes.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)