

Mestrado Integrado em Engenharia Química

***Pesquisa de determinantes genéticos em
isolados bacterianos ambientais resistentes a
antibióticos***

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da disciplina de

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Académico

Maria de La Salète Ferreira Figueiredo Silva



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Departamento de Engenharia Química

Orientador na FEUP: Prof. Doutora Olga Nunes

Co-orientador na ESB-UCP: Prof. Doutora Célia Manaia

Julho de 2008

Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Olga Nunes e Professora Doutora Célia Manaia, pela disponibilidade, conhecimentos transmitidos e ajuda prestada na elaboração do trabalho;

A todos os colegas do Laboratório da Escola Superior de Biotecnologia, Ivone Moreira, Vânia Figueira, Ana Figueiredo, Sónia Paupério e Vítor Silva, por toda a ajuda, companheirismo, ânimo e boa disposição;

Aos meus colegas da Faculdade de Engenharia, Luísa Barreiros, Cátia Faria e Carla Ferreira, por toda a ajuda, simpatia e amizade;

A minha família, pela paciência e pelo apoio incondicional;

A todos as pessoas que, apesar de não estarem mencionadas, contribuíram directa ou indirectamente na realização deste trabalho...

A todos... Muito Obrigada!

Resumo

O uso geral e massivo de antibióticos foi considerado o motivo principal do crescimento da resistência aos antibióticos em bactérias. Tornou-se necessário encontrar as causas dessa resistência, principalmente quando os isolados são provenientes de amostras de água. As bactérias desenvolveram vários mecanismos para escapar às ameaças do meio ambiente. A difusão de genes de resistência aos antibióticos nas bactérias pode, em parte, estar atribuída ao processo de transferência horizontal de genes por plasmídeos.

O principal objectivo deste trabalho foi verificar a prevalência de plasmídeos em isolados provenientes de águas de consumo e ribeiras, mas também de águas residuais brutas e águas residuais tratadas provenientes de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais que recebe principalmente efluentes domésticos. A detecção de genes de resistência a antibióticos, *bla* TEM, *bla* SHV, *bla* CTX, *bla* OXA-B e *ampC*, por amplificação por PCR usando oligonucleótidos iniciadores específicos, permitiu verificar que o gene *bla* TEM foi o mais frequentemente detectado. Por fim, através do método PCR e com *primers* específicos, verificou-se que dois dos plasmídeos detectados pertenciam ao mesmo grupo de incompatibilidade N (IncN).

Palavras Chave (Tema): plasmídeo, Enterobactérias, resistência a antibióticos, água.

Abstract

The general and massive use of antibiotics has been considered the principal reason for the increase of antibiotic resistant bacteria. It has become imperative to find major reasons for such resistance increase, mainly in water isolates. Bacteria have developed numerous mechanisms to elude environmental threats. The rapid dissemination of antibiotic resistance genes in bacterial populations can be partly attributed to plasmid-mediated horizontal transfer.

The main objective of this study was to detect the prevailing of plasmids in enterobacteria isolated from treated, untreated and stream water, but also from raw and treated water from a wastewater treatment plant receiving mainly domestic effluents. The detection of antibiotic resistance genes, *bla* TEM, *bla* SHV, *bla* CTX, *bla* OXA-B and *ampC*, using PCR with specific primers has shown that *bla* TEM was gene the most frequently detected. Finally, using the PCR method with the IncN-specific primer, it was found that two of the detected plasmids belonged to the same group of incompatibility N (IncN).

Keywords: plasmids, *Enterobacteriaceae*, antibiotic resistance, water.

Índice

1	Introdução	1
1.1	A água como veículo de dispersão de microrganismos.....	1
1.2	Os plasmídeos, um elemento importante na dispersão de genes de resistência...4	
2	Material e Métodos.....	6
2.1	Isolados bacterianos	6
2.1.1	Condições de crescimento das culturas bacterianas	6
2.1.2	Coloração de Gram.....	8
2.1.3	Teste da catalase.....	9
2.1.4	Teste da oxidase.....	9
2.2	Extracção do DNA cromossómico.....	10
2.3	Extracção do DNA plasmídico	10
2.3.1	Crescimento das culturas em meio líquido (LB)	10
2.3.2	Método de extracção	10
2.3.3	Deteção de DNA plasmídico por eletroforese em gel de agarose	12
2.4	Método PCR - Reacção de Polimerização em Cadeia	13
2.5	Purificação e sequenciação de genes.....	15
3	Ensaio de optimização de metodologias	17
3.1	Resistência as quinolonas.....	17
3.2	Mapeamento de restrição de plasmídeos	18
4	Resultados e Discussão	20
4.1	Caracterização preliminar dos isolados	20
4.2	Prevalência de plasmídeos em diferentes tipos de águas	22
4.3	Pesquisa de determinantes genéticos de resistência a antibióticos.....	26
4.4	Classificação dos plasmídeos por grupo de incompatibilidade	28
4.4.1	Grupo de incompatibilidade N (IncN)	29
4.4.2	Grupo de incompatibilidade P (IncP)	30
4.4.3	Outros grupos de incompatibilidade	31

5	Conclusões.....	32
Anexo 1	Outros	37

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema de uma Estação de Tratamento de Águas.....	2
Figura 2 - Esquema de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais	3
Figura 3 - Estrutura da uma célula bacteriana	4
Figura 4- Inoculação de uma cultura microbiana em meio sólido (PCA)	7
Figura 5 - Inoculação de uma cultura microbiana em meio de cultura líquido (LB),	7
Figura 6 - Reacção de polimerização em cadeia (PCR).....	13
Figura 7 - Gel de agarose de 1,5% obtido após a amplificação do gene <i>qnr</i>	18
Figura 8 - Gel de agarose a 1,5% após incubação do DNA plasmídico com enzimas de restrição.....	19
Figura 9 - Gel de agarose de 1% obtido na amplificação do gene para o rRNA 16S	28
Figura 10 - Gel de agarose de 1,5% obtido na amplificação do gene <i>Nkika</i> (<i>incN</i>)	29
Figura 11 - Gel de agarose de 1% obtido na amplificação do gene <i>trfA1</i> (<i>IncP</i>)	30

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Protocolos utilizados na Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR)	14
Tabela 2 - Lista dos <i>primers</i> e condições de PCR utilizados neste trabalho.....	15
Tabela 3 - Protocolos utilizados no PCR para amplificar o gene <i>qnr</i>	17
Tabela 4 - <i>Primers</i> e condições de PCR utilizados para amplificar o gene <i>qnr</i>	18
Tabela 5 - Características das enzimas de restrição utilizadas.....	19
Tabela 6 - Composição das misturas de reacção com enzimas de restrição.....	19
Tabela 7 - Listagem dos isolados bacterianos examinados neste estudo	20
Tabela 8 - Determinação da presença de DNA plasmídico em isolados de águas de consumo	23
Tabela 9 - Determinação da presença de DNA plasmídico em isolados de ribeiras	23
Tabela 10 - Determinação da presença de DNA plasmídico em isolados de águas residuais brutas.....	24
Tabela 11 - Determinação da presença de DNA plasmídico em isolados de águas residuais tratadas	25
Tabela 12 - Caracterização baseada no perfil de resistência a antibióticos em isolados com plasmídeo	26

Lista de Siglas e Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
KAc	Acetato de potássio
LB	Luria-Bertani broth
N.D.	Não determinado
PCA	Plate Count Agar
PCR	Reacção de Polimerização em Cadeia
rpm	Rotações por minuto
tris	tris(hidroximetil)aminometano

1 Introdução

1.1 A água como veículo de dispersão de microrganismos

A água desempenha uma função importante para a vida e actividades humanas considerando-se um elemento essencial para a existência dos humanos. As águas destinadas ao consumo humano estão muitas vezes sujeitas a contaminação, directa ou indirecta, por diferentes formas de poluição, nomeadamente por agentes microbianos provenientes de águas de esgotos ou de contaminantes com outra origem.

Cada vez mais se alerta para os riscos para a saúde associados ao abastecimento público da água, exigindo um controlo de qualidade cada vez mais rigoroso e o uso de recursos analíticos mais sofisticados para facilitar a detecção e a quantificação de agentes físicos, químicos e microbiológicos potencialmente perigosos para a saúde. Há muito que se reconhece que a presença de microrganismos provenientes de matérias fecais, em águas de consumo ou de recreio, pode originar uma série de doenças infecciosas causadas por bactérias, protozoários ou vírus, representando um risco para a saúde humana (Miguel, 2007).

Dentre os microrganismos presentes na água, destacam-se os de natureza exógena, tais como os provenientes de matéria fecal (incluem os coliformes totais, coliformes fecais e os enterococos), e os autóctones, que compreendem diversas espécies e fazem parte da microbiota natural da água. Possíveis contaminantes de origem fecal são, por exemplo, bactérias dos géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia* e *Citrobacter*, pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*. Estas bactérias habitam o intestino de mamíferos, como o homem, e são referências importantes na avaliação da qualidade das águas. A espécie *Escherichia coli* serve mesmo de parâmetro microbiológico básico às leis de consumo, e é de grande utilidade aos governos e empresas fornecedoras para garantir a qualidade da água para consumo humano. Nesse caso, a detecção de *Escherichia coli* em 100 ml de água significa um nível elevado de poluição e risco à saúde pela presença de organismos patogénicos (Council Directive 98/83/EC).

Os sistemas de tratamento de água são processos realizados na água bruta (água não tratada), visando obter um produto potável, química, bacteriológica e biologicamente seguro para o consumo humano. Para tal, é necessário remover ou destruir quaisquer organismos nocivos, substâncias químicas prejudiciais, bem como materiais, seja em suspensão ou em solução. O tipo de tratamento de água varia segundo a sua origem (subterrânea ou superficial), e a sua qualidade inicial. Assim, o tratamento da água para o consumo humano consiste na produção de uma água salubre que preencha os requisitos necessários ao nível da segurança química e

microbiológica. A variedade de processos de tratamento é vasta e compreende clarificação e sedimentação, filtração e desinfecção (Figura 1).

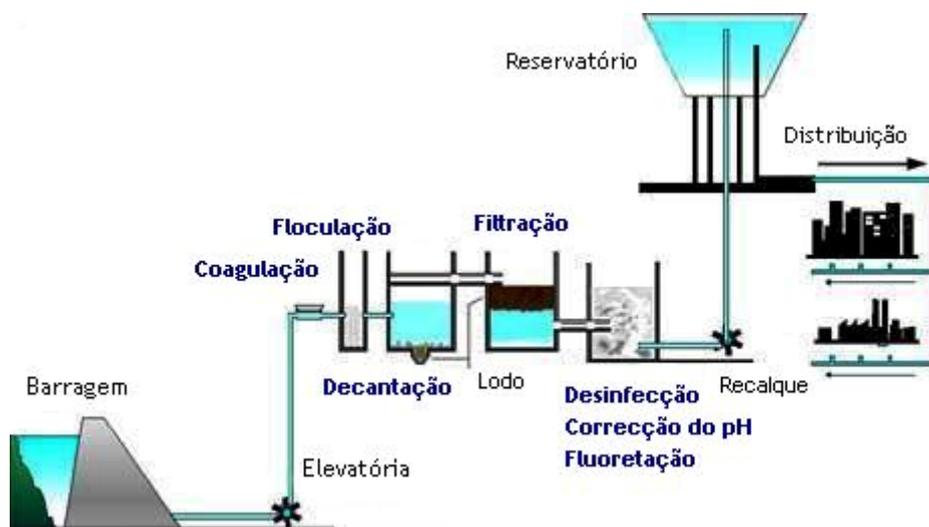


Figura 1 - Esquema de uma Estação de Tratamento de Águas

(adaptado de EMBASA, Salvador, Brasil)

A desinfecção é um passo importante no tratamento da água. Esta etapa do processo permite eliminar os organismos patogénicos, que passaram através dos filtros, e que possam continuar presentes, mas também prevenir o seu reaparecimento nos sistemas de distribuição. Sem este processo o risco de doenças relacionadas com a água seria bem superior. Nem todos os microrganismos apresentam o mesmo grau de resistência à desinfecção. De um modo geral, os vírus e protozoários são mais resistentes aos métodos de desinfecção do que as bactérias (Prescott *et al.*, 1999). Os dois métodos mais comuns para a destruição de microrganismos são a oxidação (como o cloro e o ozono), e a radiação ultravioleta (Miguel, 2007).

Depois de usada, a água é drenada para as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) onde é tratada (Figura 2), e devolvida ao meio aquático. Na ETAR as águas residuais passam por vários processos de tratamento com o objectivo de separar ou diminuir a quantidade da matéria poluente da água. O tratamento das águas recebidas inclui três etapas principais: o *tratamento preliminar* (remoção dos flutuantes através da utilização de grelhas e de crivos grossos e a separação da água residual das areias a partir da utilização de canais de areia); o *tratamento primário* (separação da matéria poluente da água por sedimentação nos sedimentadores primários); o *tratamento secundário* - ou tratamento biológico (consumo da matéria poluente por microrganismos - normalmente aeróbios - em reactores biológicos). Nalguns casos é necessário proceder à desinfecção das águas residuais tratadas ou à remoção

de determinados nutrientes como o azoto e o fósforo, que podem potenciar, isoladamente ou em conjunto, a eutrofização das águas receptoras (Brock & Madigan, 2000).

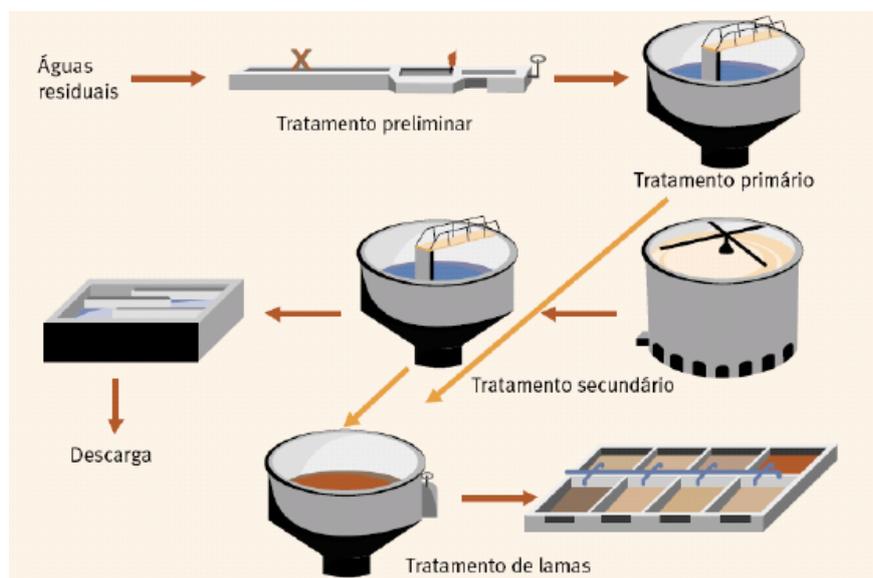


Figura 2 - Esquema de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais
(de Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação)

As estações de tratamento de águas residuais têm um papel importante na troca e proliferação de determinantes de resistência (Szczepanowski *et al*, 2004). A riqueza em matéria orgânica, e a presença de poluentes, nomeadamente resíduos de antibióticos, aliado às elevadas densidades bacterianas e à formação de biofilmes, promovem a troca genética por conjugação nos tanques de tratamento dos resíduos. A transferência para humanos de bactérias resistentes a antibióticos pode ocorrer por ingestão directa de água, ou indirectamente através da ingestão de alimentos contaminados (Pereira, s.d.).

O aparecimento de estirpes com múltipla resistência aos agentes antibacterianos constitui um problema de grande actualidade e importância para a saúde pública. O uso constante de antibióticos tais como os beta-lactâmicos (ex. penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenemas) resulta no aparecimento e propagação de estirpes multirresistentes. Por efeito, o mecanismo mais comum de resistência a estes antibióticos é a produção de beta-lactamases, enzimas que inactivam os antibióticos β -lactâmicos. Os ambientes aquáticos são considerados importantes reservatórios de genes de resistência, e reúnem as condições ideais necessárias para a propagação e evolução destes genes. Contudo, a presença de resistência a diferentes grupos de antibióticos em microrganismos não patogénicos, isolados de ambientes aparentemente inócuos, como é o caso das águas de consumo, não só é preocupante, como

coloca questões importantes, relativamente à propagação dos genes responsáveis por este tipo de resistência.

1.2 Os plasmídeos, um elemento importante na dispersão de genes de resistência

A maioria das bactérias conhecidas transporta moléculas de DNA circulares, independentes do cromossoma bacteriano, denominadas por plasmídeos (Figura 3).

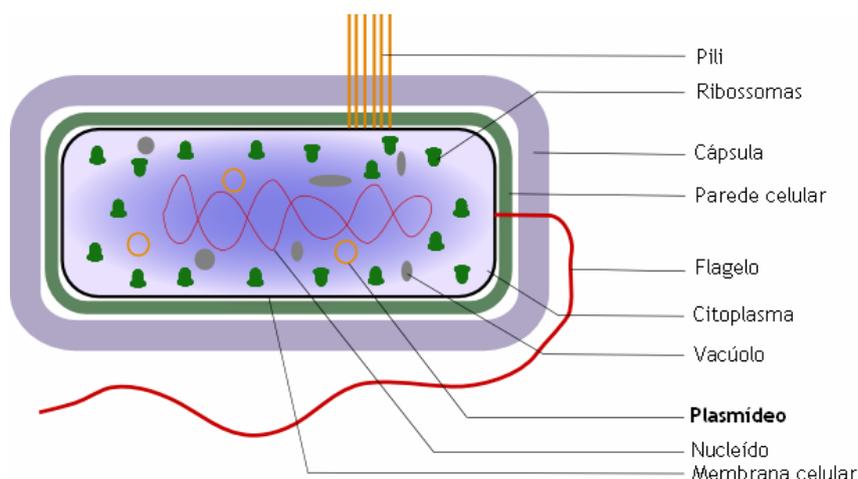


Figura 3 - Estrutura da uma célula bacteriana

(adaptado de Wikipédia)

Os plasmídeos são elementos genéticos autónomos que têm a capacidade de se replicar utilizando uma sequência de DNA que serve como uma origem de replicação ou *ori* (um ponto inicial para a replicação de DNA), e perpetuar em linhagens separadas das do cromossoma (Gonçalves, et al., 2004). Os plasmídeos têm geralmente poucos genes (< 30) e a informação que contêm não é, normalmente, essencial à bactéria hospedeira. Pode existir um elevado número de cópias em cada célula bacteriana (500 - 1000) ou apenas uma só cópia por célula. Estes podem ser eliminados por exposição a agentes que inibem a sua replicação (radiações ultra violeta, radiações ionizantes -raios γ e X) ou por crescimento a temperaturas acima da temperatura óptima.

Alguns plasmídeos podem ser incompatíveis entre eles, impedindo a co-existência de tipos diferentes num mesmo hospedeiro. Os plasmídeos que são incompatíveis pertencem ao mesmo grupo de incompatibilidade (Inc). Por exemplo, já se identificaram mais de 30 grupos de incompatibilidade em *Escherichia coli* e 13 em *Staphylococcus aureus* (Primrose et al., 2004). Os plasmídeos dizem-se incompatíveis quando partilham o mesmo mecanismo de replicação.

Há várias funções comumente associadas a plasmídeos (Prescott *et al.*, 1999). Por exemplo, o factor, que é fundamental na conjugação bacteriana; os genes responsáveis pela produção de pequenos polipéptidos (bacteriocinas) que destroem outras bactérias que não a bactéria produtora (plasmídeos Col) ou os que especificam determinadas funções metabólicas ou degradativas. Embora todas estas propriedades possam ser uma vantagem para as bactérias patogénicas, há dois tipos de função associada a plasmídeos que são particularmente relevantes em organismos com relevância clínica - os genes que potenciam a virulência do organismo e os que o tornam insensível a antibióticos e a metais pesados. Muitas vezes, os plasmídeos acumulam diversos genes de resistência, estando associados a fenótipos de multirresistência.

De facto, a multirresistência e certos factores de virulência em bactérias têm sido relacionados com a presença de plasmídeos e integrões, elementos que podem ser os responsáveis pela sua disseminação. Está também descrita uma tendência da organização de genes de resistência em “Ilhas Patogénicas”, zonas do genoma com uma elevada presença destes factores. Mediante sondas específicas para genes conhecidos e com a Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR), é possível determinar a presença ou ausência destas sequências em determinados isolados. Esta informação é muito útil para caracterizar indivíduos (ou grupos) e registar a sua dispersão na mesma base de dados onde são também integradas outras informações: perfil plasmídico, notas clínicas, antibiogramas, etc; e que têm um papel preponderante na elucidação dos mecanismos de resistência (Saavedra *et al.*, 2007).

Ao estudar os plasmídeos existentes em bactérias com resistência a antibióticos, assim como o grupo de incompatibilidade ao qual pertencem, é possível correlacionar a presença destes com o perfil de resistência e avaliar quais os antibióticos com mais probabilidade a serem transferidos para outras bactérias.

O objectivo deste trabalho consistiu em determinar a presença de plasmídeos em bactérias isoladas de vários tipos de águas: águas de ribeiras, águas de consumo, águas residuais brutas e águas residuais tratadas. Nos isolados com plasmídeo, analisou-se a presença de genes específicos resistentes aos β -lactâmicos. Por fim, tentou-se classificar os plasmídeos por grupos de incompatibilidade (IncN e IncP).

2 Material e Métodos

2.1 Isolados bacterianos

Neste trabalho estudou-se um total de 82 isolados bacterianos provenientes de águas de consumo (Estação de Tratamento de Águas - ETA, ribeiras) e de águas residuais (Estação de Tratamento de Águas Residuais - ETAR). A recolha dos isolados provenientes das águas residuais foi efectuada entre Janeiro e Novembro de 2004 na região Norte de Portugal (Ferreira da Silva *et al.*, 2007). No caso dos isolados provenientes das águas de consumo e de ribeiras, a mesma foi efectuada entre Janeiro e Maio de 2005. As estirpes foram previamente identificadas e caracterizadas pelos seus padrões de resistência antimicrobiana.

2.1.1 Condições de crescimento das culturas bacterianas

✓ *Preparação dos meios:*

A preparação do meio de cultura PCA (Plate Count Agar, Pronadisa) efectuou-se suspendendo 23,5 gramas de meio (triptona: 5 g, dextrose: 1 g, extracto de levedura: 2,5 g, agar: 15 g) num litro de água destilada. Agitou-se energicamente e levou-se à ebulição durante 1 minuto. Esterilizou-se em autoclave e distribuiu-se em placas de Petri após arrefecimento até cerca de 45 - 50 °C.

A preparação do meio LB (Luria Bertani broth) efectuou-se misturando 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levedura e 10 g/l de cloreto de sódio num balão Erlenmeyer contendo água destilada. Agitou-se até dissolver e homogeneizar, e esterilizou-se em autoclave.

Além dos meios, todo o material utilizado no estudo foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

✓ *Inoculação dos meios:*

Para inocular as culturas em meio sólido, utilizou-se o método de inoculação por estrias. Este método permite obter colónias isoladas, e realiza-se à superfície de meio sólido, com uma ansa estéril, a partir de uma suspensão ou de uma colónia isolada (Figura 4).

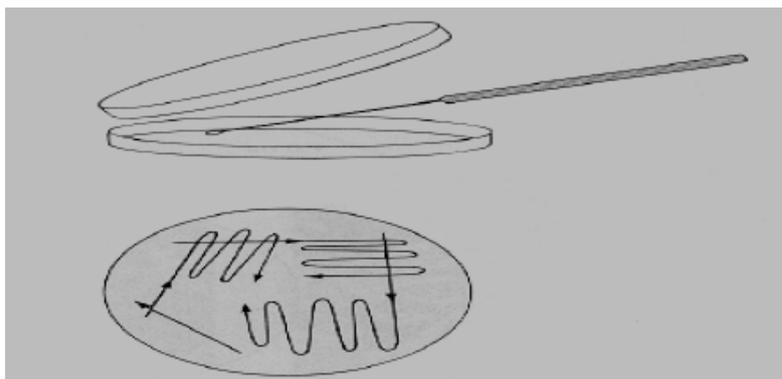


Figura 4 - Inoculação de uma cultura microbiana em meio sólido (PCA)

(Prescott *et al.*, 1999)

Para inocular o meio líquido LB utilizou-se uma pipeta de vidro estéril e adicionou-se, junto à chama, 10 ml de meio líquido LB num balão Erlenmeyer de 100 ml estéril com tampa. Com ajuda de uma ansa estéril, adicionou-se em condições de assépsia, um pouco de biomassa jovem proveniente de uma cultura em placa de Petri previamente preparada (Figura). Tapou-se o balão e colocou-se num banho com agitador orbital (120 rpm) durante cerca de 4 h, a 30 °C. No final desse período, observou-se a turbidez da cultura (D.O., a 610 nm) para verificar se o crescimento era razoável para poder fazer a extracção do DNA plasmídico.

No final desse período, observou-se a turbidez da cultura para verificar se o crescimento era razoável para poder fazer a extracção do DNA plasmídico.

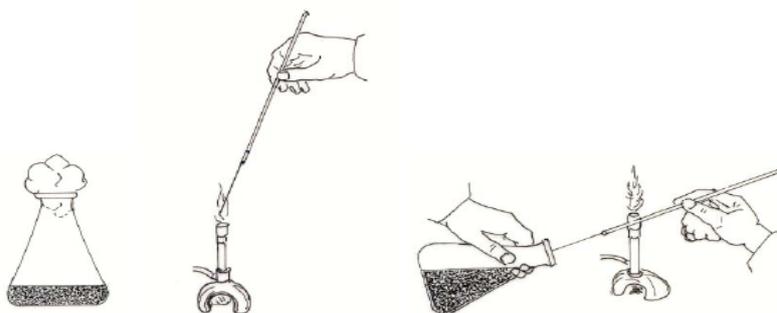


Figura 5 - Inoculação de uma cultura microbiana em meio de cultura líquido (LB)

(Prescott *et al.*, 1999)

✓ *Crescimento dos meios:*

O crescimento das culturas em meio sólido foi efectuado numa estufa a 30°C durante 24 h. O meio de cultura utilizado foi o meio PCA. O crescimento das bactérias em meio líquido LB foi efectuado em banho-maria com agitação rotativa (120 rpm) durante cerca de 4 h.

2.1.2 Coloração de Gram

A Coloração de Gram baseia-se na diferença de composição química e espessura das paredes bacterianas de que depende a permeabilidade ao álcool e à acetona e, em consequência, à dissolução mais ou menos rápida de complexos corados formados no citoplasma. Esta coloração permite dividir as bactérias em dois grandes grupos: as bactérias Gram positivas e as bactérias Gram negativas.

A coloração de Gram das estirpes isoladas foi realizada segundo o método de Hucker, de acordo com procedimento descrito por Murray *et al.* (1994):

- Colocou-se uma gota de água destilada numa lâmina de vidro e efectuou-se um esfregaço com células retiradas de uma cultura fresca em meio sólido;
- Realizou-se a fixação das células com calor;
- Efectuou-se a imersão do esfregaço no reagente de coloração (cristal violeta) durante 1 minuto e lavou-se com água corrente para retirar o excesso de corante;
- Inundou-se o esfregaço com solução de Lugol (Iodina de Gram), substância mordente que irá formar um complexo com o cristal de violeta, deixando actuar durante 60 segundos e lavou-se com água;
- Lavou-se com solvente de descoloração durante cerca de 30 segundos e novamente com água;
- Efectuou-se a imersão do esfregaço em contrastante (safranina) durante 1 minuto;
- Lavou-se com água e secou-se com papel absorvente.
- Observou-se ao microscópio óptico (Leica DC 100), utilizando a objectiva de imersão (1000 x).

Esta coloração permite classificar as bactérias como Gram positivas, se apresentam cor violeta, ou como Gram negativas, se apresentam cor vermelha.

A preparação das soluções utilizadas encontra-se a seguir:

✓ *Cristal Violeta:*

- Solução A: dissolver 2 g de cristal de violeta em 20 ml de etanol 95% (vol/vol);
- Solução B: Dissolver 0,8 g de oxalato de amónio em 80 ml de água desmineralizada;

Misturar as soluções A e B para obter o reagente de coloração cristal de violeta. Deixar repousar 24 h e filtrar por papel de filtro (Whatman n.º1) antes de usar.

✓ *Mordente - Iodo de Gram:*

- 1,0 g de iodo;
- 2,0 g de iodeto de potássio;
- Água desmineralizada até 300 ml;

Triturar o iodo e o iodeto de potássio num almofariz, adicionar a água lentamente continuando a triturar e guardar numa garrafa escura.

✓ *Solvente de descoloração:*

Etanol/acetona 80:20 (vol/vol)

✓ *Safranina:*

- 2,5 g de safranina;
- 500 ml de água destilada;
- Misturar até completa dissolução;
- Guardar num frasco escuro previamente lavado, seco e rotulado.

2.1.3 Teste da catalase

A presença da enzima catalase nas bactérias foi determinada por adição de peróxido de hidrogénio (3%, p/p) a uma cultura bacteriana (Smibert & Krieg, 1981). Se a enzima catalase estiver presente, o peróxido de hidrogénio é reduzido a água com a libertação de oxigénio (O₂), o que é considerado uma reacção positiva. Em caso contrário, estamos perante a uma reacção negativa.

2.1.4 Teste da oxidase

O teste da oxidase permite detectar a presença da enzima citocromo c oxidase responsável pela transferência de electrões do citocromo c para o oxigénio, e assim distinguir as espécies da família *Enterobacteriaceae*, aeróbias anaeróbias facultativas, das espécies da família *Pseudomonadaceae*, aeróbias estritas. O teste da oxidase foi realizado segundo o método descrito por Smibert e Krieg (1994):

- Humedeceu-se uma tira de papel de filtro com algumas gotas de uma solução de N,N,N',N'-Tetrametil-*p*-fenilenediamina dihidroclorato (TMPD, Sigma) a 1,0% (p/v);
- Com um palito de madeira estéril, esfregou-se sobre a tira de papel humedecida, biomassa de culturas jovens, crescidas em PCA.

O aparecimento de cor azul-violeta, dentro de um período de aproximadamente 10 s, indicou a presença de citocromo c oxidase.

2.2 Extracção do DNA cromossómico

As células utilizadas foram previamente cultivadas em placa de Petri com PCA e incubadas a uma temperatura de 30°C durante 24 h. Para extrair o DNA cromossómico, utilizou-se um método de fervura descrito por Wiedman-al-Ahmad *et al.* (1994). Com ajuda de uma ansa estéril, retirou-se um pouco de biomassa de uma cultura jovem e ressuspendeu-se em 50 µl de água ultra-pura (água desmineralizada filtrada através de um filtro, Pall Supor®-200, de porosidade 0,2 µm e autoclavada a 121°C durante 15 minutos, duas vezes) num microtubo de 1,5 ml. Homogeneizou-se e colocou-se em banho-maria a 95°C durante 10 minutos para proceder a lise das células. De seguida, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo durante 5 minutos para evitar a re-associação dos componentes celulares. Centrifugou-se durante cerca de 2 minutos a 13200 rpm e pipetou-se o sobrenadante (contendo o DNA cromossómico) para novo microtubo estéril. Este foi utilizado na hora, ou guardado num congelador a -20°C.

2.3 Extracção do DNA plasmídico

A preparação do DNA plasmídico a partir de bactérias é umas das técnicas mais usuais em biologia molecular. O princípio de extracção é conhecido como lise alcalina. Este método permite preparar selectivamente o DNA plasmídico contido nas bactérias, eliminando ao mesmo tempo o DNA cromossómico bacteriano.

Antes de extrair o DNA plasmídico das bactérias em estudo, efectuou-se a coloração de Gram a cada uma das culturas frescas (culturas crescidas “overnight” em meio sólido PCA a 30°C) de modo a verificar que as mesmas estavam puras. As culturas foram obtidas como se descreve acima (2.1.1)

2.3.1 Crescimento das culturas em meio líquido (LB)

As culturas foram crescidas como se descreve acima (2.1.1).

2.3.2 Método de extracção

Existem vários métodos de extracção de DNA plasmídico. Neste trabalho usou-se um kit comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) cujo método se baseia numa modificação do método de lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979). O processo, que permite a extracção de DNA plasmídico de células bacterianas, consiste em provocar a lise destas numa solução fortemente alcalina (hidróxido de sódio) contendo SDS (dodecil sulfato de sódio). Esta

solução causa simultaneamente a dissolução da membrana plasmática, a desnaturação de macromoléculas (proteínas e DNA) e a hidrólise do RNA. As macromoléculas são depois precipitadas por adição de acetato de potássio (KAc), e devido ao pH ácido desta solução, o pH do lisado é neutralizado. O reequilíbrio do pH permite a renaturação do DNA plasmídico, restabelecendo a sua conformação original. O DNA genómico, devido às suas dimensões e estrutura, não consegue voltar à sua forma nativa, permanecendo sob a forma de agregados complexos. Após a adição do KAc é possível, por centrifugação, separar um sedimento, constituído por membranas, proteínas e DNA cromossómico, de um sobrenadante onde o DNA plasmídico se encontra dissolvido (Belo, 2006). A purificação do DNA é efectuada por passagem da mistura por uma coluna contendo uma resina insolúvel (sílica) (Vogelstein & Gillespie, 1979) que tem a propriedade de fixar selectivamente o DNA. Por lavagens da resina com uma solução com etanol para o manter insolúvel, purifica-se o DNA que é, posteriormente, eluído com um tampão de eluição.

A extracção do DNA plasmídico foi efectuada da seguinte forma:

1. Após crescimento das culturas em meio líquido LB, transferiu-se a cultura para um tubo e centrifugou-se a 13200 rpm durante 30 segundos;
2. Removeu-se o sobrenadante por aspiração, deixando o sedimento o mais seco possível;
3. Ressuspendeu-se o sedimento em 250 µl de solução de ressuspensão, agitou-se bem em vortex para completa dispersão do sedimento, e transferiu-se para um microtubo estéril de 1,5 ml.

A partir deste passo, a manipulação teve de ser efectuada com luvas para proteger o DNA

4. Adicionou-se 250 µl de solução de lise e homogeneizou-se por inversão rápida do microtubo (4-6 vezes) até que a solução se tornou clara e ligeiramente viscosa (*não se fez “vortex” para evitar a ruptura do DNA cromossómico e não se incubou durante mais de 5 min para evitar a desnaturação do DNA plasmídico*);
5. Adicionou-se 350 µl de solução de neutralização e misturou-se de imediato, invertendo o microtubo 4 a 6 vezes (homogeneizou-se suavemente após a adição desta solução para evitar precipitações localizadas de detritos de células bacterianas);
6. Centrifugou-se 5 min a 13200rpm numa microcentrífuga e transferiu-se o sobrenadante para uma coluna fornecida no kit (sem perturbar ou transferir o precipitado branco);
7. Centrifugou-se durante 1 minuto, eliminou-se o líquido e colocou-se novamente a coluna no mesmo tubo de recolha;

8. Adicionou-se 500 µl de solução de lavagem (previamente diluída com etanol) na coluna e centrifugou-se durante 30 a 60 segundos, eliminou-se o líquido e colocou-se no mesmo tubo de recolha;
9. Repetiu-se o processo de lavagem (etapa 9) utilizando 500 µl de solução de lavagem;
10. Eliminou-se o líquido, centrifugou-se durante mais 1 minuto para remover resíduos da solução de lavagem (etapa essencial para evitar resíduos de etanol) e transferiu-se a coluna para um novo microtubo de 1,5 ml;
11. Adicionou-se 50 µl de tampão de eluição no centro da membrana da coluna a fim de eluir o DNA plasmídico (teve-se cuidado para não tocar na membrana com a ponta da pipeta), incubou-se durante 2 min à temperatura ambiente e centrifugou-se durante 2 min.
12. Eliminou-se a coluna e armazenou-se o DNA plasmídico purificado a -20°C.

2.3.3 Detecção de DNA plasmídico por electroforese em gel de agarose

Após extracção, utilizou-se a eletroforese em gel de agarose para verificar a presença de plasmídeos. A eletroforese em gel é uma técnica de separação de moléculas com carga eléctrica não nula, geralmente utilizada para separar proteínas e moléculas de DNA e RNA.

Para preparar o gel de agarose, pesou-se num balão Erlenmeyer a quantidade necessária de agarose (Pronadisa), dependendo da concentração desejada, e dissolveu-se em Tampão TAE 1x previamente preparado. A dissolução efectuou-se com ajuda de calor utilizando uma placa térmica com agitação magnética. Após completa dissolução (gel translúcido), adicionou-se 0,5 µl/mL de brometo de etídio 2,5 mg/ml e verteu-se para um molde previamente preparado com pentes. Deixou-se polimerizar durante cerca de 30 minutos. Após terminada a polimerização do gel, retirou-se os pentes e colocou-se numa tina de eletroforese contendo Tampão TAE 1x. O gel ficou completamente imerso no tampão. Antes de aplicar as amostras nos poços do gel, misturou-se 5 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 10x concentrado) com 10 µL de amostra (produto PCR). Em quase todos os ensaios utilizou-se o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (BioLabs).

Na maioria dos casos, a eletroforese decorreu a 90 V durante 40 min. Após terminado esse tempo, visualizou-se o gel num transiluminador (Gel Doc 2000 - Bio Rad). Depois de utilizado o gel era habitualmente reutilizado mais uma vez, procedendo-se para tal a uma nova fusão do gel e polimerização.

As soluções utilizadas foram previamente preparadas como segue:

- Azul Bromofenol: 0,25% de Azul Bromofenol em 30% de Glicerol

- Tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA): 4,84 g/l de Tris; 0,68 g/l de acetato de sódio anidro; 0,37 g/l de EDTA (sal sódico); pH ajustado a 8 com ácido acético; Volume aferido a 1 l.
- Brometo de etídeo: Solução aquosa a 2,5 mg/ml.

2.4 Método PCR - Reacção de Polimerização em Cadeia

O método de PCR (polymerase chain reaction), introduzido inicialmente por Saiki et al. (1985) e Mullis & Faloona (1987), foi utilizado para tentar obter uma ampliação selectiva de genes de interesse.

A técnica de PCR baseia-se no processo de replicação de DNA que ocorre *in vitro*. Durante o PCR são usadas temperaturas elevadas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (“primers”), também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleótidos, obtidos por síntese química. Para amplificar uma determinada região, são necessários dois iniciadores complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3’, de modo a permitir a actuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar (Figura 6). Esta técnica permite copiar uma molécula, vários biliões de vezes, em poucas horas (Eidne, 1991).

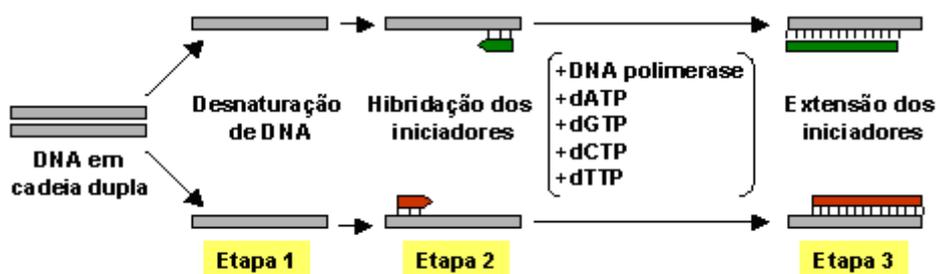


Figura 6 - Reacção de polimerização em cadeia (PCR)

(Grupo de Ciências Biológicas do IST, 2005)

Para realizar um PCR é necessária uma pequena quantidade de DNA alvo, convenientemente extraído da amostra, uma solução tampão salina contendo a DNA polimerase (Taq), oligonucleótidos iniciadores, os quatro desoxinucleótidos constituintes do DNA (ATP, TTP, CTP, GTP) e o cofactor Mg^{2+} , indispensável para a actividade da enzima.

Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem em:

- Desnaturação do DNA alvo pelo calor (tipicamente 1 minuto a 94-96°C), de modo a separar as duas cadeias;

- Associação dos iniciadores por ligações de hidrogénio ao DNA alvo em cadeia simples. Para permitir essa associação, a mistura de reacção é arrefecida (tipicamente a temperaturas entre 50 e 65°C, durante 1 minuto);
- Extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase.

A quantidade de DNA final é dada pela seguinte função exponencial: $N = N_0 \cdot 2^n$

sendo: N - Número final de cadeias de DNA

N_0 - Número inicial de DNA molde

n - Número de repetições do ciclo

A concentração final de DNA molde na solução é muito maior do que a inicial, sendo possível a sua identificação (Vieira, s.d.).

Durante todo o trabalho, as manipulações de DNA foram efectuadas com luvas numa câmara de fluxo laminar (Telstar, Bio-II-A). O protocolo utilizado para cada um dos PCRs efectuado encontra-se na tabela seguinte:

Tabela 1 - Protocolos utilizados na Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR)

	Bla TEM	ampC	Bla SHV	Bla CTX	Bla OXA-B	Integrase	IncN kika	IncP trfA1
Água ultra-pura (µl)	3,8	3,6	3,4	3,4	4,48	2,84	5,2	5,2
Tampão de reacção com KCl (µl) (100 mM Tris-HCl - pH 8,8 a 25°C, 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40)	1	1	1	1	-	1	1,25	1,25
Tampão de reacção com (NH ₄) ₂ SO ₄ (µl) (750 mM Tris-HCl - pH 8.8 a 25°C, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1% Tween 20)	-	-	-	-	1	-	-	-
MgCl ₂ (25mM) (µl)	0,6	0,6	0,6	0,6	1,2	0,8	2,2	2,2
dNTP's (1 mM) (µl)	2	2	2	2	1	2	3	3
Primer Fw (50 µM) (µl)	0,2	0,3	0,4	0,4	0,06	0,33	0,2	0,2
Primer Rev (50 µM) (µl)	0,2	0,3	0,4	0,4	0,06	0,33	0,2	0,2
Taq DNA polimerase (2.5U/µl) (µl) (Fermentas Recombinante)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
DNA molde (µl)	2	2	2	2	2	2,5	0,25	0,25
Volume total da reacção (µl)	10	10	10	10	10	10	12,5	12,5

As características dos *primers* utilizados no PCR, tanto a nível de determinação de genes de resistência, como de grupos de incompatibilidade dos plasmídeos extraídos estão descritos na tabela seguinte:

Tabela 2 - Lista dos *primers* e condições de PCR utilizados neste trabalho

Primer	Sequência (5' - 3')	Condições de PCR				Tamanho do fragmento (bp)
		Desnaturação	Anilhamento	Extensão	Ciclos	
bla TEM (fw) bla TEM (rev)	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A	94 °C, 1 min	55 °C, 1min	72 °C, 1 min 30 s	30	1200
ampC (fw) ampC (rev)	TTC TAT CAA (AC)AC TGG CA(AG) CC CC(CT) GTT TTA TGT ACC CA(CT) GA	94 °C, 1 min	49 °C, 1min	72 °C, 1 min 30 s	30	550
bla CTX (fw) bla CTX (rev)	TTA ATG ATG ACT CAG AGC ATT C GAT ACC TCG CTC CAT TTA TTG	94 °C, 1 min	51.5 °C, 1 min	1 min 30 s	30	901
OXA-B (fw) OXA-B (rev)	CAA GCC AAA GGC ACG ATA GTT G CTC AAC CCA TCC TAC CCA CC	94 °C, 30 s	56 °C, 30 s	72 °C, 1 min	30	561
bla SHV (fw) bla SHV (rev)	TCG GGC CGC GTA GGC ATG AT AGC AGG GCG ACA ATC CCG CG	94 °C, 1 min	62 °C, 1 min	72 °C, 1 min 30 s	30	700
Intl 1 (fw) Intl 1 (rev)	CCT CCC GCA CGA TGA TC TCC ACG CAT CGT CAG GC	94 °C, 30 s	55 °C, 30 s	72 °C, 30 s	35	280
NkikA (fw) NkikA (rev)	ACT TAC CTT TAT CAA CAT TCT GGC CGA CTG GTT ACT TCC ACC TTC GC	94 °C, 1 min	55 °C, 1 min	72 °C, 1 min	40	329
PtrfA1 (fw) PtrfA1 (rev)	ATG ACG ACC AAG AAG CG AAC CCC CAG CCG GAA CTG	94 °C, 1 min	57 °C, 1 min	72 °C, 1 min	40	889

(Fontes: Henriques *et al.*, 2006; Göetz *et al.*, 1996)

A reacção de amplificação foi efectuada num termociclador (Biometra) e a visualização do produto de PCR em gel de agarose foi realizada como se descreve acima (2.3.3).

2.5 Purificação e sequenciação

Para a purificação do produto de PCR obtido, utilizou-se -se um kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Bio-Science). O processo de purificação do DNA obtido envolveu os passos seguintes:

- Colocou-se uma coluna fornecida pelo kit num microtubo estéril e 1,5 ml;
- Adicionou-se 500 µl de tampão de captura e a quantidade de produto PCR obtido (~50 µl) à coluna, homogeneizou-se fazendo “up and down” com a pipeta (4 a 6 vezes), centrifugou-se numa microcentrífuga a 13200 rpm durante 30 segundos e removeu-se o líquido do microtubo;
- Adicionou-se 500 µl de solução de lavagem na coluna, centrifugou-se novamente a 13200 rpm durante 30 segundos, e removeu-se o líquido obtido no microtubo;

- Colocou-se a coluna num microtubo novo e estéril e aplicou-se 50 µl de tampão de eluição (10mM Tris-HCl pH 8.0, TE pH 8.0) directamente no centro da membrana da coluna;
- Incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugou-se a 13200 rpm durante 1 minuto, obtendo assim a amostra purificada.

Após purificação do produto PCR, este foi enviado para uma empresa onde foi sequenciado (Macrogen na Coreia, ou Stabvida em Portugal). A sequência obtida foi analisada usando o Programa BioEdit, e foi comparada com as sequências existentes numa base de dados, GenBank, disponível na internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), permitindo assim a sua identificação.

3 Ensaios de otimização de metodologias

Apesar de não terem fornecido resultados conclusivos, foram efectuados alguns ensaios úteis que poderão ser importantes em trabalhos futuros.

3.1 Resistência a quinolonas

As quinolonas são agentes antimicrobianos de largo espectro bastante usadas em medicina. A sua resistência tem vindo a aumentar de maneira significativa em vários países desde a sua utilização. Por exemplo, na China, mais de 50% dos isolados clínicos de *Escherichia coli* são resistentes à ciprofloxacina (Wang et al., 2003). A actividade bactericida das quinolonas resulta da inibição da girase do DNA, enzima essencial à replicação e transcrição do DNA.

A resistência às quinolonas é usualmente causada por mutações cromossómicas, mas a resistência mediada por plasmídeos foi descoberta recentemente e disseminou-se de forma rápida. O primeiro mecanismo descrito foi aquele relacionado com o gene *qnr* (Wang et al, 2003).

Assim, durante estes primeiros ensaios, tentou-se otimizar o protocolo usando o método PCR (descrito em 2.5.1) para amplificar o gene *qnr* que codifica a resistências às quinolonas. Os ensaios foram efectuados em enterococos e enterobactérias. Na tabela seguinte encontra-se as quantidades de reagente utilizadas em cada reacção:

Tabela 3 - Protocolos utilizados no PCR para amplificar o gene *qnr*

Reagentes	Volume (µl)
Água ultra-pura	3,8
Tampão de reacção com KCl (100 mM Tris-HCl - pH 8.8 a 25 °C, 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40)	1
MgCl ₂ (25 mM)	0,6
dNTP's (1mM)	2
Primer Fw (50 µM)	0,2
Primer Rev (50 µM)	0,2
Taq DNA polimerase (2.5 U/µl) (Fermentas Recombinante)	0,2
DNA molde	2
Volume total da reacção	10

As características do primer utilizadas no PCR estão descritas na tabela seguinte:

Tabela 4 - Primers e condições de PCR utilizados neste ensaio

Primer	Sequência (5' - 3')	Condições de PCR				Tamanho do fragmento pretendido (bp)
		Desnaturação	Anilhamento	Extensão	Ciclos	
<i>qnr</i> (fw) <i>qnr</i> (rev)	GGT TAT GGA TAT TAT TGA TAA AG CTA ATC AGG CAG CAC TAT TA	95°C, 30s	48°C, 30s	72°C, 30s	30	661

Após várias tentativas, verificou-se a obtenção de uma banda próxima da banda pretendida no isolado E3FC20 (*Escherichia coli*) proveniente de águas residuais tratadas. A reacção de amplificação por PCR foi efectuada para 3 isolados, S3R25 (*Klebsiella pneumoniae*), A6FC32 (*Escherichia coli*) e E3FC20. Os produtos do PCR foram visualizados em electroforese de gel de agarose.

Na figura 7 encontra-se a fotografia do gel obtido na amplificação do gene *qnr*.

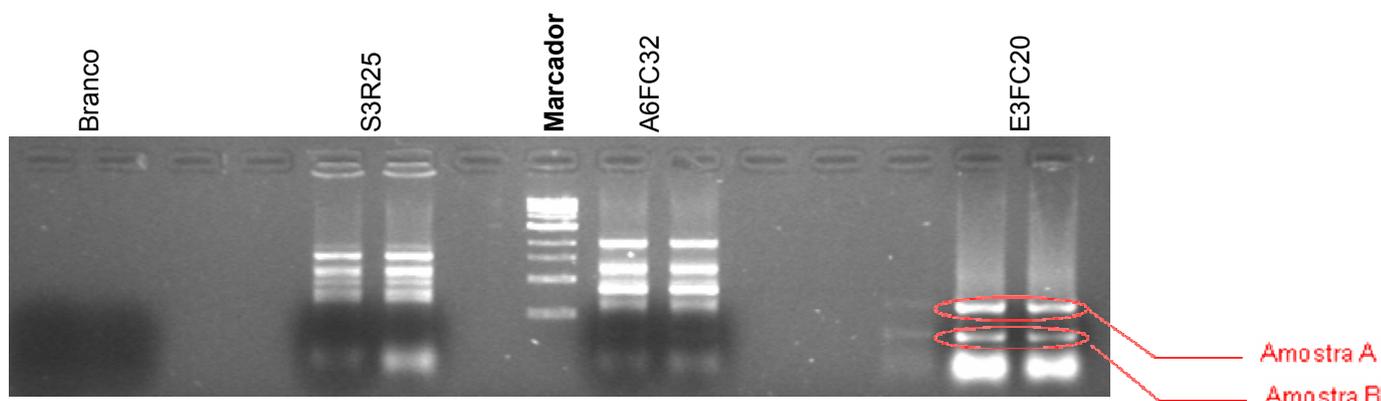


Figura 7 - Gel de agarose de 1,5% obtido após a amplificação do gene *qnr*

As amostras A e B foram purificadas e enviadas para sequenciar de acordo com o procedimento descrito em 2.4.

A análise da sequência do fragmento amplificado (amostra A), e utilizando a base de dados GenBank, verificou-se que essa banda não era a banda representativa do gene *qnr*.

3.2 Mapeamento de restrição de plasmídeos

As endonucleases de restrição catalisam a clivagem do DNA de cadeia dupla em locais específicos. No ensaio que foi efectuado, utilizou-se as seguintes enzimas de restrição (Bioron).

Tabela 5 - Características das enzimas de restrição utilizadas

Enzima	Sequência de reconhecimento 5' - 3' / 5' - 3'
Bam HI	G GATCC / CCTAG G
Hind III	A AGCTT / TTCGA A
Eco RI	G AATTC / CTTAA G
Taq1	T CGA / AGC T

Após o corte do plasmídeo com enzimas de restrição, este apresenta um perfil electroforético característico que depende do espaçamento entre os locais de restrição. A comparação entre os perfis de restrição obtidos para diferentes moléculas de DNA, permite estimar o grau de semelhança entre elas (Manaiá, 1999).

Assim, este ensaio tinha como objectivo classificar os plasmídeos comparando os perfis de restrição dos mesmos. No entanto, nenhum dos ensaios efectuados mostrou resultados positivos. Abaixo apresentam-se as quantidades de reagente utilizadas num dos ensaios:

Tabela 7 - Composição das misturas de reacção com enzimas de restrição

Reagentes	Tubo 1 (μ l)	Tubo 2 (μ l)	Tubo 3 (μ l)	Tubo 4 (μ l)	Tubo 5 (μ l)
ddH ₂ O	10	7	7	7	7
Sol NEB 2 (10x)	2	-	-	-	-
Sol SEBuffer G (10x) + BSA	-	1,8 + 0,2	-	-	-
Sol Reaction buffer W (10x) + BSA	-	-	1,8 + 0,2	-	-
Sol Reaction buffer EcoRI (10x) + BSA	-	-	-	1,8 + 0,2	-
Sol Buffer Taq1 (10x)	-	-	-	-	2
DNA	8	10	10	10	10
Bam HI	-	1	-	-	-
Hind III	-	-	1	-	-
Eco RI	-	-	-	1	-
Taq1	-	-	-	-	1

Incubou-se as misturas em banho-maria a 37°C durante 2 h e aplicou-se as amostras em de gel de agarose (1,5%). Deixou-se desenvolver durante 90 minutos (90 V, 400 mA).

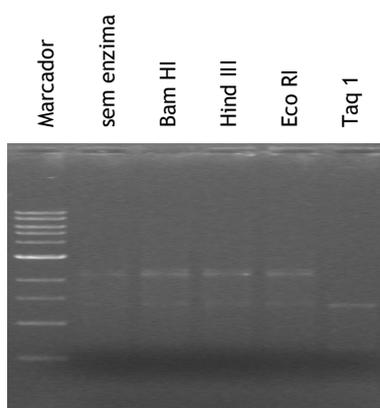


Figura 8 - Gel de agarose a 1,5% após incubação do DNA plasmídico com enzimas de restrição.

Dado que nenhum dos ensaios permitiu obter perfis de restrição dos plasmídeos em estudo, em trabalhos futuros, seria interessante aumentar a quantidade de DNA plasmídico.

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização preliminar dos isolados

Neste trabalho estudaram-se 82 isolados provenientes de um sistema de distribuição de água de consumo, de águas de ribeiras e de águas residuais de uma ETAR. As bactérias foram isoladas utilizando diferentes meios de cultura: meio m-FC (Difco), meio m-Endo-LES (Difco) e meio PCA (Merck) (Ferreira da Silva *et al.*, 2006).

Os isolados foram previamente identificados e caracterizados por outros grupos de estudo.

Na tabela seguinte encontra-se a listagem dos isolados, Gram negativo, catalase positivo e oxidase negativo, organizados pela sua proveniência - águas de consumo (BxEy), ribeiras (SxRy), águas residuais brutas (AxFC/EL/Py) e águas residuais tratadas (ExFC/EL/Py).

Tabela 7 - Listagem dos isolados bacterianos examinados neste estudo

Isolados	Tipo de água	Identificação
S1R41	Ribeiras	<i>Escherichia coli</i>
S1R44	Ribeiras	<i>Escherichia coli</i>
S1R62	Ribeiras	<i>Escherichia coli</i>
S2R35	Ribeiras	<i>Escherichia coli</i>
S2R44	Ribeiras	<i>Escherichia coli</i>
S3R22	Ribeiras	<i>Escherichia coli</i>
S4R14	Ribeiras	<i>Escherichia coli</i>
S4R19	Ribeiras	<i>Escherichia coli</i>
S1R45	Ribeiras	<i>Escherichia coli</i>
S3R25	Ribeiras	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
S4R12	Ribeiras	<i>Raoultella terrigena</i>
B1E14	águas de consumo	<i>Citrobacter</i> sp.
B1E17	águas de consumo	<i>Citrobacter</i> sp.
B10E9	águas de consumo	<i>Enterobacter hormaechei</i>
B10E8	águas de consumo	<i>Escherichia coli</i>
B10E12	águas de consumo	<i>Flavobacterium</i> sp.*
B3E6	águas de consumo	<i>Klebsiella planticola</i>
B1E22	águas de consumo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
B9E7	águas de consumo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
B10E2	águas de consumo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
B1E21	águas de consumo	<i>Klebsiella</i> sp.
B4E7	águas de consumo	<i>Klebsiella</i> sp.
B12E6	águas de consumo	<i>Kluyvera ascorbata</i>

Continuação Tabela 7

Isolados	Tipo de água	Identificação
E3EL2	águas residuais tratadas	Enterobactérias
E3EL3	águas residuais tratadas	Enterobactérias
E3EL8	águas residuais tratadas	Enterobactérias
E5EL18b	águas residuais tratadas	Enterobactérias
E5EL20	águas residuais tratadas	Enterobactérias
E6EL19	águas residuais tratadas	Enterobactérias
E6EL27	águas residuais tratadas	Enterobactérias
E6EL29	águas residuais tratadas	Enterobactérias
E6EL43	águas residuais tratadas	Enterobactérias
E7EL56	águas residuais tratadas	Enterobactérias
E3FC24	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E3FC42	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E3FC53	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E3FC54	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E4FC22	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E4FC8	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E5FC11	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E5FC19	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E5FC24b	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E5FC25	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E6FC15	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E6FC19	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E6FC28	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E6FC4	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
E6FC5	águas residuais tratadas	<i>Escherichia coli</i>
A2EL10	águas residuais brutas	Enterobactérias
A3EL19	águas residuais brutas	Enterobactérias
A5EL12	águas residuais brutas	Enterobactérias
A5EL40	águas residuais brutas	Enterobactérias
A5EL5	águas residuais brutas	Enterobactérias
A5EL51	águas residuais brutas	Enterobactérias
A5EL55	águas residuais brutas	Enterobactérias
A5EL7	águas residuais brutas	Enterobactérias
A6EL1	águas residuais brutas	Enterobactérias
A7EL29	águas residuais brutas	Enterobactérias
A8EL8	águas residuais brutas	Enterobactérias
AEL3	águas residuais brutas	Enterobactérias
A2P34	águas residuais brutas	Enterobactérias
A2P35	águas residuais brutas	Enterobactérias
A6P59	águas residuais brutas	Enterobactérias
A6P60	águas residuais brutas	Enterobactérias
A7P23	águas residuais brutas	Enterobactérias

Continuação Tabela 7

Isolados	Tipo de água	Identificação
A7P46	águas residuais brutas	Enterobactérias
A8P28	águas residuais brutas	Enterobactérias
A2FC20	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A3FC26	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A4FC1	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A4FC10	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A4FC39	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A4FC4	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A4FC6	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A4FC7	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A5FC18	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A5FC23a	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A5FC24	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A5FC30	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A5FC34	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A6FC32	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>
A6FC7	águas residuais brutas	<i>Escherichia coli</i>

* citocromo oxidase positivo

De acordo com a Tabela 7, podemos verificar que as bactérias isoladas das ribeiras são na maioria *Escherichia coli*. No caso das águas de consumo, encontraram-se principalmente bactérias dos géneros *Klebsiella* e *Citrobacter*. Nas águas residuais, tanto antes como depois do tratamento em ETAR, isolaram-se enterobactérias e mais precisamente *Escherichia coli*.

Estas bactérias são típicas da flora intestinal, como também das águas residuais.

4.2 Prevalência de plasmídeos em diferentes tipos de águas

Os plasmídeos são elementos genéticos autónomos que têm a capacidade de se replicar e propagar autonomamente, ou seja independentemente do cromossoma. Estes podem codificar características que conferem vantagens fenotípicas às bactérias que os contêm nomeadamente a resistência a agentes antimicrobianos (Gonçalves, 2004). Além disso, podem ser facilmente transferidos para bactérias vizinhas, por transferência horizontal de genes, contribuindo para a rápida disseminação das características que codificam, como por exemplo a resistência a antibióticos ou metais pesados. Assim, a pesquisa de plasmídeos nas bactérias isoladas das águas de consumo, das ribeiras e das águas residuais, sobretudo em contextos nos quais se pretende avaliar o nível e tipologia de resistência a antibióticos, revela-se um elemento muito importante.

Na tabela seguinte apresenta-se o tamanho dos plasmídeos extraídos das bactérias isoladas, assim como o fenótipo de resistência a vários antibióticos:

Tabela 8 - Determinação da presença de DNA plasmídico em isolados de águas de consumo

Isolados	Identificação	Extracto de DNA plasmídico Tamanho das bandas (bp)	Fenótipo de resistência ⁽¹⁾	Nº de resistências ⁽²⁾
B1E14	<i>Citrobacter</i> sp.	---	CIP, SXT, TE, KF, TIC, RL, S	R7
B1E17	<i>Citrobacter</i> sp.	6000	SXT, TE, TIC, RL, S	R5
B10E9	<i>Enterobacter hormaechei</i>	---	AML, SXT, TE, KF, CT, S	R6
B10E8	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, SXT, TE, KF, CT, RL, S	R7
B10E12	<i>Flavobacterium</i> sp.*	---	CN, MEM, TIC, CT, RL, S	R6
B3E6	<i>Klebsiella planticola</i>	6500,>10000	AML, SXT, TIC, CT, RL	R5
B10E2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	---	AML, KF, TIC, CT, RL, S	R6
B1E22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3000,5000 7000,>10000	AML, CT, RL	R3
B9E7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	---	AML, TIC, CT, RL	R4
B1E21	<i>Klebsiella</i> sp.	---	AML, TIC, RL, S	R4
B4E7	<i>Klebsiella</i> sp.	1200,2000	AML, TIC, RL, S	R4
B12E6	<i>Kluyvera ascorbata</i>	1600	AML, KF, TIC, CT, RL	R5

⁽¹⁾ AML - amoxicilina; CAZ - ceftazidima; CN - gentamicina; CIP - ciprofloxacina; ipm - imipenem; SXT - sulfametoxazol/trimetoprim; TE - tetraciclina; KF - cefalotina; MEM - meropenem; TIC - ticarcilina; CT - Colistin Sulfate; S - sulfametoxazole; ⁽²⁾R1, R2, R3: resistentes a pelo menos um, dois ou três antibióticos, respectivamente.

De acordo com a informação fornecida na Tabela 8, 42% das bactérias proveniente das águas de consumo e examinadas neste estudo apresentam plasmídeos. Os plasmídeos detectados tinham pesos moleculares entre 1200 bp e mais de 10000 bp, sendo que tanto os mais pequenos como os maiores foram observados em membros do género *Klebsiella*.

Na tabela seguinte apresenta-se o tamanho dos plasmídeos extraídos das bactérias isoladas das águas de ribeiras.

Tabela 9 - Determinação da presença de DNA plasmídico em isolados de ribeiras

Isolados	Identificação	Extracto de DNA plasmídico Tamanho das bandas (bp)	Fenótipo de resistência*	Nº de resistências**
S1R41	<i>Escherichia coli</i>	3000,5000,7000,>10000	AML, KF, TIC, RF	R4
S1R44	<i>Escherichia coli</i>	1800,3400	AML, TE, TIC, CT, S	R5
S1R62	<i>Escherichia coli</i>	1800,3100,>10000	AML, SXT, TIC, CT, RL, S	R6
S2R35	<i>Escherichia coli</i>	várias	AML, CIP, CTX, TIC, RL, S	R6
S2R44	<i>Escherichia coli</i>	2900,4900,8000	AML, SXT, TE, S	R4
S3R22	<i>Escherichia coli</i>	2000,4000	AML, CIP, SXT, TE, TIC, RL, S	R7
S4R14	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, KF, TIC, CT, RL, S	R6
S4R19	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, KF, TIC, CT, RL, S	R6
S1R45	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, SXT, TE, TIC, RL, S	R6
S3R25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1300,2700,3200,>10000	AML, CN, CIP, KF, TIC, RL, S	R7
S4R12	<i>Raoultella terrigena</i>	---	AML, KF, TIC, CT, RL, S	R6

De acordo com a informação fornecida pela Tabela 9, 64% das bactérias provenientes de águas de ribeiras examinadas neste estudo apresentam plasmídeos. Nestes isolados, a

presença de múltiplas bandas no extracto de DNA plasmídico é ainda mais acentuada do que no caso dos isolados de águas de consumo, e pode indiciar a contaminação com DNA cromossômico fragmentado. Este aspecto deverá ser explorado em estudos posteriores.

Na tabela seguinte apresenta-se o tamanho dos plasmídeos extraídos das bactérias isoladas das águas de residuais brutas.

Tabela 10 - Determinação da presença de DNA plasmídico em isolados de águas residuais brutas

Isolados	Identificação	Extracto de DNA plasmídico Tamanho das bandas (bp)	Fenótipo de resistência*	Integrões	Nº de resistências**
A2EL10	Enterobactérias	---	AML, TE, E, TIC, S	N.D.	R5
A2P34	Enterobactérias	---	AML, CIP, SXT, TE, TIC, RL	N.D.	R6
A2P35	Enterobactérias	---	CIP, SXT, CAZ, RL	N.D.	R4
A3EL19	Enterobactérias	---	CT, RL, S	N.D.	R3
A5EL12	Enterobactérias	---	AML, SXT, TIC, RL, S	N.D.	R5
A5EL40	Enterobactérias	1500,>10000	AML, CN, TE, KF, TIC, RL, S	+	R7
A5EL5	Enterobactérias	1500	AML, CN, CIP, SXT, TE, KF, TIC, RL, S	+	R9
A5EL51	Enterobactérias	Várias	AML, KF, TIC, RL	-	R4
A5EL55	Enterobactérias	5000	AML, TIC	+	R2
A5EL7	Enterobactérias	1800	AML, CN, CIP, SXT, TE, KF, TIC, RL, S	+	R9
A6EL1	Enterobactérias	10000	AML, TE, TIC, CT, S	+	R5
A6P59	Enterobactérias	---	AML, CIP, TE, TIC, CT, RL	N.D.	R6
A6P60	Enterobactérias	3000	AML, KF, RL	-	R3
A7EL29	Enterobactérias	---	AML, CN, CIP, SXT, TE, KF, MEM, CAZ, TIC, RL, S	N.D.	R11
A7P23	Enterobactérias	---	AML,CIP, RL	N.D.	R3
A7P46	Enterobactérias	8100	AML, CIP, SXT, TIC, RL, S	+	R5
A8EL8	Enterobactérias	>10000,>10000	AML, KF, TIC, CT, RL, S	-	R6
A8P28	Enterobactérias	1400,2800	AML, CN, CIP, SXT, KF, TIC, CT, RL, S	-	R9
AEL3	Enterobactérias	várias	KF, CT	N.D.	R2
A2FC20	<i>Escherichia coli</i>	1300,>4000	KF	N.D.	R1
A3FC26	<i>Escherichia coli</i>	1600,2700,>10000	KF	N.D.	R1
A4FC1	<i>Escherichia coli</i>	1500,1600,5000,6000 >10000	AML, TIC, SXT, RL, TE	N.D.	R5
A4FC10	<i>Escherichia coli</i>	4800,8000	AML,TIC, SXT, RL, TE	N.D.	R5
A4FC39	<i>Escherichia coli</i>	2000,3000,5000	AML, TIC, SXT, RL, CIP,TE	N.D.	R6
A4FC4	<i>Escherichia coli</i>	>10000	AML, SXT, RL, TE, KF	N.D.	R5
A4FC6	<i>Escherichia coli</i>	>10000	AML, TIC, SXT, RL, TE	N.D.	R5
A4FC7	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, TIC, RL	N.D.	R3
A5FC18	<i>Escherichia coli</i>	3000,>10000	AML, TIC, CN, SXT, RL, TE	N.D.	R6
A5FC23a	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, TIC, TE	N.D.	R3
A5FC24	<i>Escherichia coli</i>	3000,>10000	AML,TIC, SXT, RL, CN, TE	N.D.	R6
A5FC30	<i>Escherichia coli</i>	1750,2700,4500,6500	AML, TIC, SXT, RL, TE	N.D.	R5
A5FC34	<i>Escherichia coli</i>	5000,7000,>10000	AML,TIC, SXT, RL, TE, KF	N.D.	R6
A6FC32	<i>Escherichia coli</i>	1500,2000,6000,>10000	AML ,TIC, SXT,RL,CIP,TE	N.D.	R6
A6FC7	<i>Escherichia coli</i>	---	AML,TIC, SXT,RL, TE	N.D.	R5

De acordo com a informação fornecida pela Tabela 10, 68% das bactérias provenientes das águas residuais brutas examinadas neste estudo apresentam plasmídeos. Estes plasmídeos foram detectados principalmente em bactérias isoladas em meio m-FC, identificadas como *Escherichia coli*.

Na Tabela 11 apresentam-se os resultados obtidos nas bactérias isoladas das águas residuais tratadas.

Tabela 11 - Determinação da presença de DNA plasmídico em isolados de águas residuais tratadas

Isolados	Identificação	Extracto de DNA plasmídico Tamanho das bandas (bp)	Fenótipo de resistência*	Integrões	Nº de resistências**
E3EL2	Enterobactérias	---	AML, SXT, TE, KF, TIC	N.D.	R5
E3EL3	Enterobactérias	---	AML, CN, TE, KF, TIC, CT, RL, S	N.D.	R8
E3EL8	Enterobactérias	1150,2000,3800 6000,>10000	AML, CIP, KF, IPM, CAZ, TIC, CT, RL, S	-	R9
E5EL18b	Enterobactérias	8000	AML, CN, TE, KF, RL, S	+	R6
E5EL20	Enterobactérias	1500	AML, CIP, SXT, TE, KF, TIC, CT, RL, S	+	R9
E6EL19	Enterobactérias	Várias	AML, TE, TIC, RL, S	+	R5
E6EL27	Enterobactérias	---	AML, CIP, RL, S	N.D.	R4
E6EL29	Enterobactérias	---	AML, SXT, TE, TIC	N.D.	R4
E6EL43	Enterobactérias	---	AML, SXT, TE, TIC, RL, S	N.D.	R6
E7EL56	Enterobactérias	1400, 2100, 5000	AML, CN, TE, KF, MEM, CAZ, TIC, CT, RL, S	-	R10
E3FC24	<i>Escherichia coli</i>	1000,1500,4500 >10000	AML, TIC, SXT,RL, CN, TE	N.D.	R6
E3FC42	<i>Escherichia coli</i>	1700,2050	AML, TIC, CN, KF	N.D.	R4
E3FC53	<i>Escherichia coli</i>	1100,1500	AML,TIC,CIP,SXT,TE,KF	N.D.	R6
E3FC54	<i>Escherichia coli</i>	1250,2900,4200 8000,>10000	AML,TIC,SXT,RL,CN,TE,KF	N.D.	R7
E4FC22	<i>Escherichia coli</i>	1100,3050,3800, 9500,>10000,>10000	AML,TIC,SXT,RL,CIP,TE,KF	N.D.	R7
E4FC8	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, TIC, RL, TE	N.D.	R4
E5FC11	<i>Escherichia coli</i>	1100	AML, SXT, RL, TE	N.D.	R4
E5FC19	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, TIC, SXT, RL, TE	N.D.	R5
E5FC24b	<i>Escherichia coli</i>	2400,3200,4500	AML, TIC, SXT, RL, TE	N.D.	R5
E5FC25	<i>Escherichia coli</i>	2400,3200,4500	AML,TIC,SXT,RL,CIP,TE,KF	N.D.	R7
E6FC15	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, TIC, SXT, RL, TE	N.D.	R5
E6FC19	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, TIC	N.D.	R2
E6FC28	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, TIC, RL	N.D.	R3
E6FC4	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, TIC, SXT, RL	N.D.	R4
E6FC5	<i>Escherichia coli</i>	---	AML, TIC, SXT, RL	N.D.	R4

De acordo com a informação fornecida pela Tabela 11, 52% das bactérias provenientes de águas residuais tratadas examinadas neste estudo apresentam plasmídeos. Embora o presente estudo não esteja ajustado para permitir fazer uma robusta comparação dos tamanhos dos plasmídeos os dados das Tabelas 10 e 11 parecem indicar que em isolados de *Escherichia coli*

de águas residuais tratadas há uma relativa diminuição do tamanho e frequência destes elementos genéticos. Este será outro dado que poderá ser importante explorar em estudos posteriores.

Contrariamente ao que se poderia esperar, tendo em consideração o potencial dos plasmídeos como vectores de dispersão de genes de resistência, os fenótipos de multi-resistência não se encontravam necessariamente associados nem à presença de plasmídeos nem a um maior tamanho destes. Esta observação é transversal às diferentes espécies examinadas e origem dos isolados. Assim, será de admitir que os fenótipos de resistência resultam de genes localizados no DNA cromossómico ou em mega-plasmídeos (>20000 pb) que não seriam extraídos com o método utilizado neste estudo. Por outro lado, 9 dos 14 extractos de DNA plasmídico em que se examinou a presença do gene da integrase, apresentaram resultado positivo. O gene da integrase é indicativo da presença de integração de classe 1, local privilegiado para a ocorrência de recombinação sítio-específica em que comumente se alojam cassetes de genes de resistência, originando um fenótipo de resistência. Estes dados demonstram que poderá ser oportuno prosseguir com a pesquisa do gene de integrase em plasmídeos. Além disso, o mapeamento genético dos plasmídeos em estudo poderá dar pistas interessantes sobre o tipo de funções associadas a estes elementos genéticos.

4.3 Pesquisa de determinantes genéticos de resistência a antibióticos

Um dos aspectos que torna os plasmídeos moléculas relevantes em termos de resistência é a sua conhecida capacidade para albergar e transferir determinantes genéticos responsáveis por conferir fenótipos de tolerância. Nesse contexto, pesquisaram-se nos extractos de DNA plasmídico, alguns genes que codificam enzimas beta-lactamases e que são frequentemente reportados na literatura como estando associados a estes elementos extra-cromossómicos.

Tabela 12 - Caracterização baseada no perfil de resistência a antibióticos em isolados com plasmídeo

Isolados	Identificação	Extracto de DNA plasmídico Tamanho das bandas (bp)	Genes de resistência									
			TEM		AmpC		SHV		CTX		OXA-B	
			P	C	P	C	P	C	P	C	P	C
B1E17	<i>Citrobacter</i> sp.	6000	-	-	-	-	-	N.D.	-	+	-	N.D.
E3EL8	Enterobactérias	1150,2000,3800,6000,>10000	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
E5EL18b	Enterobactérias	8000	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
E5EL20	Enterobactérias	1500	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
E6EL19	Enterobactérias	Várias	+	-	-	+	-	N.D.	-	-	-	-
E7EL56	Enterobactérias	1400,2100,5000	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
A5EL40	Enterobactérias	1500,>10000	+	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
A5EL5	Enterobactérias	1500	+	+	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
A5EL51	Enterobactérias	Várias	+	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.

Continuação da Tabela 12

Isolados	Identificação	Extracto de DNA plasmídico Tamanho das bandas (bp)	Genes de resistência									
			TEM		AmpC		SHV		CTX		OXA-B	
			P	C	P	C	P	C	P	C	P	C
A5EL55	Enterobactérias	5000	+	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
A5EL7	Enterobactérias	1800	+	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
A6EL1	Enterobactérias	10000	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
A6P60	Enterobactérias	3000	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
A7P46	Enterobactérias	8100	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
A8EL8	Enterobactérias	>10000,>10000	+	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
A8P28	Enterobactérias	1400,2800	N.D.	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	+	N.D.
AEL3	Enterobactérias	Várias	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
S1R41	<i>Escherichia coli</i>	3000,5000,7000,>10000	+	+	+	+	-	N.D.	-	-	-	N.D.
S1R44	<i>Escherichia coli</i>	1800,3400	-	+	+	+	-	N.D.	-	-	N.D.	N.D.
S1R62	<i>Escherichia coli</i>	1800,3100,>10000	+	+	-	+	-	N.D.	-	-	-	N.D.
S2R35	<i>Escherichia coli</i>	Várias	+	+	+	+	-	N.D.	-	-	-	N.D.
S2R44	<i>Escherichia coli</i>	2900,4900,8000	+	+	+	+	-	N.D.	-	-	-	N.D.
S3R22	<i>Escherichia coli</i>	2000,4000	+	+	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.
E3FC24	<i>Escherichia coli</i>	1000,1500,4500,>10000	+	+	-	N.D.	-	N.D.	-	-	-	N.D.
E3FC53	<i>Escherichia coli</i>	1100,1500	+	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
E3FC54	<i>Escherichia coli</i>	1250,2900,4200,8000,>10000	+	+	+	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.
E4FC22	<i>Escherichia coli</i>	1100,3050,3800,9500,>10000	+	-	-	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.
E5FC11	<i>Escherichia coli</i>	1100	+	-	-	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.
E5FC24b	<i>Escherichia coli</i>	2400,3200,4500	+	-	-	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.
E5FC25	<i>Escherichia coli</i>	4500,8000,>10000	+	+	-	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.
A2FC20	<i>Escherichia coli</i>	1300,>4000,muitas	-	-	-	N.D.	-	N.D.	-	-	-	N.D.
A3FC26	<i>Escherichia coli</i>	1600,2700,>10000	-	-	+	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.
A4FC1	<i>Escherichia coli</i>	1500,1600,5000,6000,>10000	+	+	-	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.
A4FC10	<i>Escherichia coli</i>	4800,8000	+	+	-	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.
A4FC39	<i>Escherichia coli</i>	2000,3000,5000	+	+	+	N.D.	-	-	-	-	-	N.D.
A4FC4	<i>Escherichia coli</i>	>10000	-	-	-	N.D.	-	-	-	-	N.D.	N.D.
A5FC18	<i>Escherichia coli</i>	3000,>10000	+	+	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
A5FC34	<i>Escherichia coli</i>	5000,7000,>10000	+	+	-	N.D.	-	N.D.	N.D.	-	-	N.D.
A5FC30	<i>Escherichia coli</i>	1750,2700,4500,6500	+	N.D.	+	N.D.	-	N.D.	-	+	-	N.D.
A5FC24	<i>Escherichia coli</i>	3000,>10000	+	+	-	N.D.	-	-	-	+	-	N.D.
A6FC32	<i>Escherichia coli</i>	1500,2000,6000,>10000	+	-	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.
E3FC42	<i>Escherichia coli</i>	1700,2050	N.D.	-	-	N.D.	-	N.D.	-	+	-	N.D.
B3E6	<i>Klebsiella planticola</i>	6500,>10000	-	-	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.
S3R25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1300,2700,3200,>10000,>10000	-	-	-	-	-	N.D.	+	-	-	N.D.
B1E22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3000,5000,7000,>10000	+	-	+	-	-	N.D.	-	+	-	N.D.
B4E7	<i>Klebsiella sp.</i>	1200,2000	-	-	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.
B12E6	<i>Kluyvera ascorbata</i>	1600	-	-	-	-	-	N.D.	+	+	-	N.D.

*P - extracto de DNA plasmídico; C- extracto de DNA total; N.D. - não determinado

A análise da Tabela 12 mostra que o gene que codifica *bla*TEM é o mais frequentemente encontrado nos isolados analisados e que aparece frequentemente associado a extractos de DNA plasmídico. Em termos de frequência, segue-se o gene *ampC*, muitas vezes presente em isolados que possuem também *bla*TEM. O gene *bla*SHV não foi detectado em qualquer dos isolados, e *bla*CTX e *bla*OXAB apenas em dois e um isolado, respectivamente. Estes dados sugerem que estas β -lactamases poderão não ser comuns em isolados de enterobactérias de origem ambiental, e suscitam o interesse por alargar este estudo a um número maior de isolados. Um dos aspectos interessante a aprofundar será também verificar a presença dos genes pesquisados em DNA cromossómico ou em DNA plasmídico. Embora nalguns isolados se possa concluir sobre a presença dos genes num ou noutro tipo de DNA, noutros casos o gene foi detectado em ambos os extractos de DNA. Assim sendo, será de admitir a possibilidade de existir DNA cromossómico contaminante nos extractos de DNA plasmídico. Esta possibilidade não poderá ser excluída já que a amplificação do gene para o rRNA 16S, cromossómico, foi obtida com sucesso em grande parte dos extractos de DNA plasmídico (Figura 9). Sabe-se que o gene para o rRNA 16S pode existir em cópia múltipla no cromossoma podendo, uma pequena contaminação, originar um resultado positivo, facto que não ocorrerá necessariamente com os genes que codificam as β -lactamases. No entanto, e uma vez realizada esta análise em extractos de DNA plasmídico, importará, numa fase seguinte, purificar o DNA plasmídico e fazer a pesquisa dos genes em extractos de DNA plasmídico purificado.

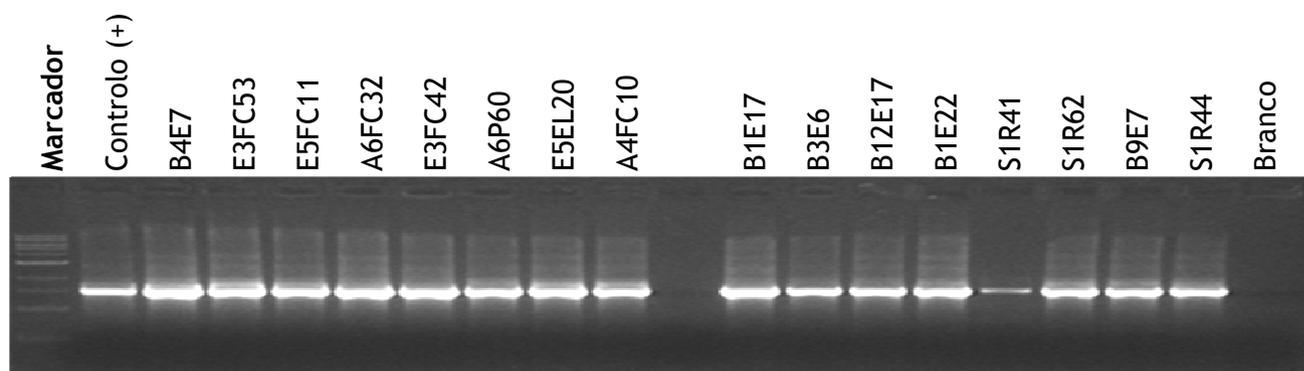


Figura 9 - Gel de agarose de 1% obtido na amplificação do gene para o rRNA 16S

4.4 Classificação dos plasmídeos por grupo de incompatibilidade

Os grupos de incompatibilidade dos plasmídeos determinam, de certo modo, a gama de hospedeiros que os podem albergar. Tradicionalmente os grupos de incompatibilidade são determinados pela introdução, por conjugação ou por transformação, de um plasmídeo de um grupo de incompatibilidade desconhecido, numa estirpe que albergue um plasmídeo de grupo conhecido (Carattoli *et al.*, 2005). Devido à morosidade deste processo, têm vindo a ser desenvolvidos métodos mais fáceis e rápidos, designadamente por recurso a PCR (Götz *et al.*

1996; Carattoli *et al.*, 2005). A determinação dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos em isolados de diferentes origens, reveste-se de interesse, na medida em que diversos trabalhos têm sugerido a existência de uma relação entre o tipo de plasmídeo e o habitat. Por exemplo, os plasmídeos do grupo IncP têm sido apontados como vectores de disseminação de resistência a antibióticos em águas residuais (Schlüter *et al.*, 2007). Foi neste contexto que se decidiu averiguar os tipos de incompatibilidade nos extractos de DNA plasmídico.

4.4.1 Grupo de incompatibilidade N (IncN)

De acordo com o protocolo utilizado por Götz *et al.* (1996), e usando o método PCR, estudou-se a incompatibilidade existente entre os plasmídeos extraídos das diferentes águas. Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (2.3.3).

Utilizaram-se os oligonucleótidos iniciadores Nkika (fw) e Nkika (rev) para identificar o grupo de incompatibilidade N (IncN). Dado que o peso molecular esperado, 329bp, era bastante baixo, efectuou-se um gel com 1,5% de agarose e utilizou-se um marcador de baixo peso molecular (de 10bp a 300bp). A seguir apresenta-se um dos géis obtidos com alguns isolados estudados:

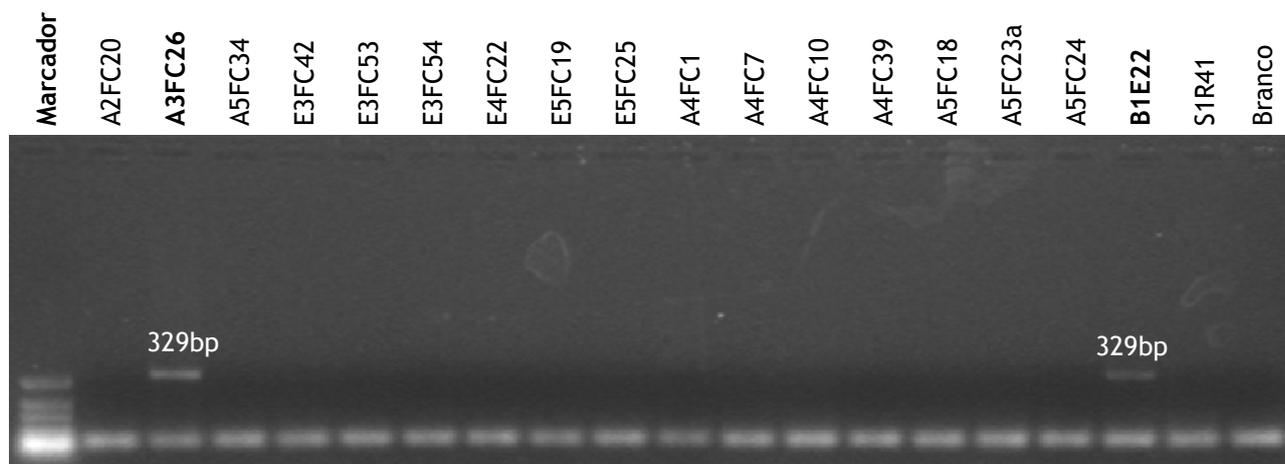


Figura 10 - Gel de agarose de 1,5% obtido na amplificação do gene *Nkika* (incN)

Dado que não possuíamos nenhum controlo positivo, purificou-se o produto de PCR obtido para a amostra A3FC26 e sequenciou-se (conforme descrito em 2.4.). A percentagem de similaridade obtida, após uma pesquisa por BLAST ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com o gene *kikA* (plasmídeo IncN) foi de 99%, sendo então possível utilizar essa amostra como controlo positivo.

Após a amplificação do gene em todos os isolados, verificou-se que apenas dois pertenciam ao grupo de incompatibilidade N: A3FC26 (*Escherichia coli*), isolado das águas residuais brutas, e B1E22 (*Klebsiella pneumoniae*), isolado das águas de consumo.

4.4.2 Grupo de incompatibilidade P (IncP)

Da mesma forma, com o método PCR, amplificou-se o gene *trfA1* usando os oligonucleótidos iniciadores específicos PtrfA1 (fw) e PtrfA1 (rev).

Após várias tentativas, e usando o mesmo protocolo (ver 2.4), verificou-se a existência de uma banda no isolado E3FC54 (*Escherichia coli*), proveniente de águas residuais tratadas, próxima da pretendida (889 bp). No entanto, a análise da sequência do fragmento amplificado, e utilizando a base de dados GenBank, verificou-se que essa banda não era a banda representativa do gene *trfA1* (plasmídeo IncP).

Na figura seguinte, encontra um dos géis obtidos após amplificação do gene *trfA1*:

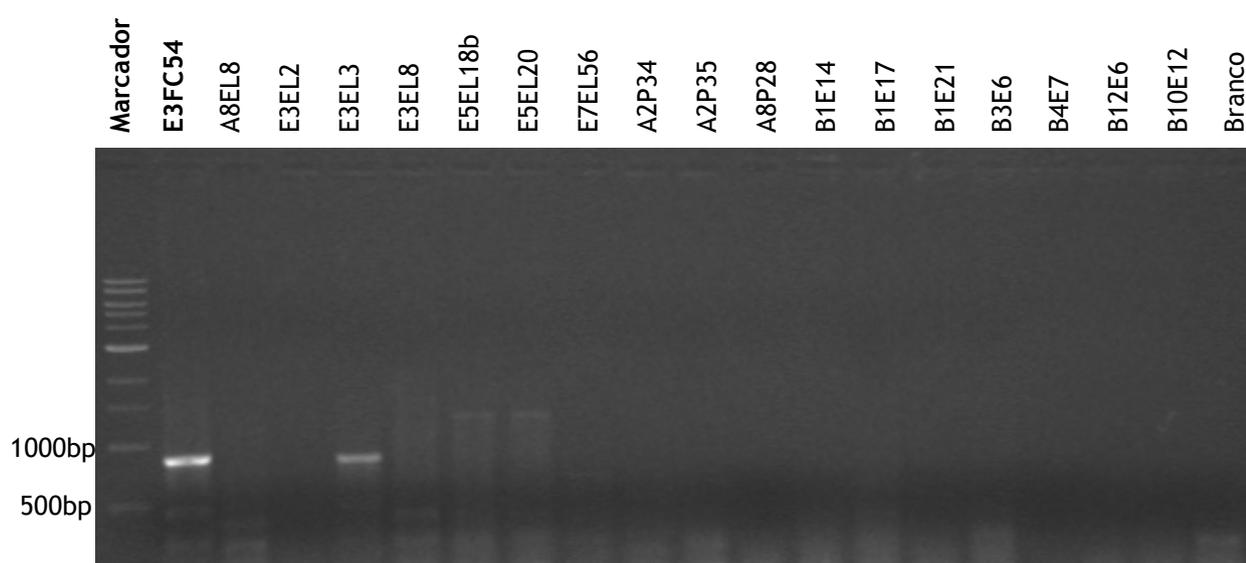


Figura 11 - Gel de agarose de 1% obtido na amplificação do gene *trfA1* (IncP)

Apesar de não ter encontrado nenhuma amostra de DNA plasmídico que amplificasse o gene *trfA1* (IncP), efectuou-se a amplificação do mesmo nas restantes amostras e verificou-se que as amostras S2R44 (*Escherichia coli*), isolada de ribeiras, e E3EL3 (Enterobactéria), isolada de águas residuais tratadas, amplificaram uma banda semelhante à encontrada com E4FC54.

Visto que não se conseguiu otimizar o método para a detecção de plasmídeos pertencentes ao grupo de incompatibilidade P (IncP), não é possível concluir sobre a abundância destes plasmídeos nos isolados examinados. No entanto, seria de esperar que muitos deles estariam classificados nesse grupo de incompatibilidade. Por efeito, têm-se demonstrado que a maioria dos plasmídeos isolados em águas residuais é deste tipo (Schlüter *et al*, 2007).

4.4.3 Outros grupos de incompatibilidade

Embora só se tenha efectuado o estudo relativamente a dois grupos de incompatibilidade de plasmídeos, é de salientar que existem muitos outros grupos de incompatibilidade na literatura (Göetz *et al.*, 1996; Carattoli *et al.*, 2005).

5 Conclusões

O estudo realizado confirmou a elevada prevalência de plasmídeos em enterobactérias isoladas de águas residuais, de ribeiras ou mesmo em águas de consumo.

A presença de plasmídeos, passíveis de serem extraídos pela metodologia utilizada, não está aparentemente associada a fenótipos de resistência múltipla.

Nos extractos de DNA plasmídico examinados detectou-se sobretudo o gene *bla*TEM. O gene para a integrase de integrões de classe 1 foi também relevante.

Em sistemas de tratamento de águas residuais, poderá ocorrer o *curing* (perda) de plasmídeos ou de parte do seu conteúdo devido ao stress imposto pelo processo.

Como perspectiva futura relacionada com o desenvolvimento deste trabalho, seria interessante efectuar a purificação os extractos de DNA plasmídico e continuar a pesquisa de genes, principalmente o gene da integrase.

Outros ponto de grande interesse para trabalhos futuros, seria analisar com mais profundidade a possibilidade de existir contaminação com DNA cromossómico fragmentado nos extracto de DNA plasmídico dos isolados provenientes das águas de ribeiras.

Por fim, seria interessante analisar a possível relação existente entre o tratamento das águas residuais em ETARs, o tamanho e a frequência de plasmídeos.

Referências

- Abastecimento de Água - etapas de tratamento. [em linha]. Salvador, Brasil. [Consultado em 18 de Julho de 2008]. Disponível em URL: http://www.embasa.ba.gov.br/etapas_tratamento.asp
- Ádria, C., Coliformes totais e fecais - Detecção em amostras de água através do teste de Presença-Ausência (P/A), segundo CETESB - L5.240. Universidade Estadual de Campinas, Centro Superior de Educação Tecnológica, Tecnologia em Saneamento Ambiental, Campinas.
- Barbosa, A. F. (2006) Molecular detection of β -lactamases in β -lactam resistant Enterobacteriaceae; Tese Mestrado.
- Belo, J. (2006) Programa e protocolos práticos da disciplina de laboratórios de Engenharia Genética. [em linha]. Faro. [Consultado em Maio de 2008]. Disponível em URL: <http://w3.ualg.pt/~jbelo/documentos/Labprotocols-LEG%202006.pdf>
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, vol. 7, 1513 -1522.
- Brock, T.D., Madigan M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2000) *Biology of Microorganisms*. 9th edition, Prentice Hall, New Jersey.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. and Threlfall, E. J. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 63 , 219- 228.
- Eidne, K.A. (1991) The polymerase reaction and its uses in endocrinology. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 2, 69-175.
- Estação de Tratamento de Águas Residuais típica. Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação. [em linha]. [Consultado em Julho de 2008]. Disponível em URL: <http://www.ineti.pt/download.aspx?id=CD033DD40CB11EB111AA7B61D9F3B8C8>

- Ferreira da Silva M., Tiago T., Veríssimo A., Boaventura A.R., Nunes O.C. and Manaia C.M. (2006) Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 55, 322-329.
- Göetz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschäpe, H., Van Elsas, J.D. and Smalla, K. (1996) Detection and Characterization of Broad-Host-Range Plasmids in Environmental Bacteria by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, 2621-2628.
- Gonçalves, P. and Castro, I. (2004) Efeito da Aplicação de Lamas Residuais Urbanas na Diversidade da População Rizobiana do Solo. *Silva Lusitana*, vol. 12, 95 - 104.
- Grupo de Ciências Biológicas do IST (2005) - Fundamentos da Técnica de PCR. [em linha]. Lisboa. [Consultado em Julho de 2008]. Disponível em URL: <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=339>
- Henriques, I. S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M. J. and Correia, A. (2006) Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicilin-resistant isolates from estuarine waters. *Research in Microbiology*, vol. 157, 938-947.
- Köhler, T., Pechère, J. C. and Plésiat, P. (1999) Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cellular and molecular life sciences*, vol. 56, 771-778.
- Manaia, C. (1999) *Disciplina de Genética molecular. Mapeamento de restrição de um plasmídeo*. UCP-ESB, Porto.
- Miguel, A. L. (2007) *Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogénicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL*. Lisboa.
- Moretti, P. E. (2007) *Plasmídios Bacterianos. Microbiologia, Saúde e Ambiente - Seção 1 Bacteriologia - Parte 5 Genética*.
- Mullis, K.B. and Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, vol. 155, 335-350.
- Murray, R. G., Doetsch R. N. and Robinow C. F. Determinative and cytological light microscopy. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. (1994) *Methods*

for general and molecular bacteriology. Washington: American Society for Microbiology. 21-40.

- Pereira, C. (s.d.) Prevalência e diversidade de integroes em bactérias isoladas de uma estação de tratamento de águas residuais. Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, Aveiro.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (1999) Marine and Freshwater Environments. Microbiology, 4th ed, WCB/McGraw-Hill Edition, USA, 852-884
- Primrose, S., Twyman, R. and Old, R. (2004) Principes de Génie Génétique. De Boeck, 1ªedição.
- Saavedra, M. J., Martínez-Murcia, A., Mota, V., Fontes, C., Martins, C. and Correia, A. (2007) Diversidade filogenética e resistência a antibióticos na microbiota de transmissão hídrica: um problema de segurança alimentar. Aveiro.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. Science, vol. 230 (4732), 1350-1354.
- Smibert R. and Krieg N. (1981) General characterization. 411-442. In Gerhardt, P., Murray, R., Costilow, R., Nester, E., Wood, W., Krieg, N. and Phillips, G. Manual methods for general microbiology. American Society for Microbiology, Washington, USA.
- Smibert, R. M. and Krieg, N. R. (1994) Phenotypic characteristics. In Methods for General and Molecular Biology, 607-654. Edited by Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., and Top, E. M. (2007) Genomics of IncP-antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for widely accessible drug resistance gene pool. FEMS Microbiology Reviews, vol. 31, 449-477.
- Szczepanowski, R., Krahn, I., Linke, B., Goesmann, A., Pühler, A. and Schlüter, A. (2004) - Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different

resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology*, vol. 150, 3613-3630.

- Tratamento da água. Porto: Porto Editora, 2003-2008. [Consultado em 22 de Junho de 2008]. [Em linha]. Disponível em URL: [http://www.infopedia.pt/\\$tratamento-da-agua](http://www.infopedia.pt/$tratamento-da-agua)>.
- Vieira, D. (s.d.). Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. [Consultado em 07 de Abril de 2008]. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. [Em linha]. Disponível em URL: <http://www.imtsp.fm.usp.br/Proto/aula3.pdf>
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, vol. 76, 615-619.
- Wang, M., Tran, J. H., Jacoby, G. A., Zhang, Y., Wang, F. and Hooper, D. C. (2003) Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 2242-2248.
- Wiedman-al-Ahmad, M., Tichy, H.V. and Schon, G. (1994) Characterization of *Acinetobacter* type strains and isolates obtained from wastewater treatment plants by PCR finger printing. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, 4066-4071.

