UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro
Departamento de Bioquímica e Microbiologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA)

VANESSA DA COSTA ANDRADE

ENTEROBACTERIALES NO LITORAL DE SÃO PAULO: DIVERSIDADE, RESISTÊNCIA E SUA RELAÇÃO COM A CONTAMINAÇÃO COSTEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)

Rio Claro – SP
2020

VANESSA DA COSTA ANDRADE

ENTEROBACTERIALES NO LITORAL DE SÃO PAULO: DIVERSIDADE, RESISTÊNCIA E SUA RELAÇÃO COM A CONTAMINAÇÃO COSTEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)

Orientadora: Profa. Dra. Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira

Rio Claro – SP
2020

A553e

Andrade, Vanessa da Costa
Enterobacteriales no litoral de São Paulo: diversidade, resistência e sua relação com a contaminação costeira / Vanessa da Costa Andrade. -- Rio Claro, 2020
149 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira

1. qualidade microbiológica. 2. balneabilidade. 3. resistência. 4. Enterobacteriaceae. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE VANESSA DA COSTA ANDRADE, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE RIO CLARO.

Aos 05 dias do mês de março do ano de 2020, às 13:30 horas, no(a) Sala 111 - Bloco Didático I - Superior Setor A, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. ANA JULIA FERNANDES - Orientador(a) do(a) Instituto de Biociências / UNESP - Campus do Litoral Paulista, Prof. Dr. ROBERTO FIORAVANTI CARELLI FONTES do(a) Instituto de Biociências / UNESP - Campus do Litoral Paulista, Profa. Dra. CRISTIANE ANGÉLICA OTTONI do(a) Instituto de Biociências / UNESP - Campus do Litoral Paulista, Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES do(a) Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro, Profa. Dra. FLÁVIA MARISA PRADO SALDANHA do(a) Instituto Oceanográfico / Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de VANESSA DA COSTA ANDRADE, intitulada ***ENTEROBACTERIALES* NO LITORAL DE SÃO PAULO: DIVERSIDADE, RESISTÊNCIA E SUA RELAÇÃO COM A CONTAMINAÇÃO COSTEIRA.**

Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. ANA JULIA FERNANDES

Prof. Dr. ROBERTO FIORAVANTI CARELLI FONTES

Profa. Dra. CRISTIANE ANGÉLICA OTTONI

Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES

Profa. Dra. FLÁVIA MARISA PRADO SALDANHA

Dedico o presente trabalho à minha família e aos meus amigos. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Segundo a Teoria da Relatividade Geral de Einstein (1915), o Futuro já aconteceu. O tempo passa, dependendo de seu observador, podendo ser mais rápido para uns, ou mais lento para outros... basta movimentar-se. Depois destes quatro anos de doutorado, tenho mais certeza de que o tempo é relativo. Tiveram momentos em que passou muito devagar, e eu ficava desesperada para acabar logo. Em outros, ele simplesmente evaporou, e gostaria de poder parar o tempo para aproveitar mais. E num piscar de olhos, estes quatro anos voaram. Mas uma coisa eu garanto: aproveitei cada milésimo de segundo como o último, aproveitando desde as coletas debaixo de chuva, as madrugadas no laboratório, até as bobagens nos intervalos de experimentos.

Com muita alegria, termino mais um ciclo acadêmico. Mas não poderia esquecer de agradecer todas as pessoas que foram importantes nesta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e pela bolsa de PDSE.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada), a todos os docentes, colegas e profissionais envolvidos no programa.

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia e todos os funcionários.

À Profa. Dra. Ana Júlia por esses onze anos de parceria! Obrigada por ser uma mãe para todos nós do Micromar! Obrigada pelas oportunidades de ter trabalhado e troca de aprendizados, acadêmicos e da vida. Agradeço imensamente não só pela orientação, mas acima de tudo agradeço a amizade, paciência, ombro amigo, conselhos, conversas, discussões, puxões de orelha. Obrigada por sempre acreditar em nós, até mesmo nos momentos difíceis. E o mais importante: muito obrigada por nunca ter deixado eu desistir. Sem nenhuma sombra de dúvidas, todo seu esforço faz parte da minha formação acadêmica, profissional e pessoal. AJ, muito obrigada, de coração!

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia Marinha (MicroMar) da UNESP de São Vicente e a todos integrantes e ex-integrantes, mas especialmente agradeço à Bruna (Bru), Roberta (Rô), Aline (Castanha) e Raphaela (Rapha), pelas risadas, companheirismo, desabafos, torcidas, perrengues, bebedeiras internacionais, amizade e cumplicidade durante TODOS esses anos. Aliás, quantas

aventuras passamos juntas! Como sempre: com muita emoção né? Hahaha. Perrengues, risadas, choros, desesperos, desabafos, torcidas, abraços e acima de tudo: amizade.

Rô e Erik, obrigada por me hospedarem quando precisava virar noites e mais noites no laboratório. Rô, obrigada por todo apoio, risadas, colo, desabafo, nachos e acima de tudo: nossa amizade!

Bru, obrigada por tudo! Desde a graduação estamos nesta jornada acadêmica, mas ficamos muito mais próximas a partir do mestrado. São pelo menos seis anos de muita parceria, risadas, disciplinas, torcidas, desabafos e conselhos. Obrigada por nos transmitir essa calma (e que calma!) sempre! Pois é amiga, conseguimos!

Castanhola, minha linda, mesmo distante vc sempre nos ajudando e torcendo por nós. Obrigada por todos os conselhos, puxões de orelha de irmã mais velha, ajudas, conversas. Apesar de sentir sua falta física, você sempre se faz presente.

À Universidade de Aveiro - UA (Portugal) e ao Departamento de Biologia (DBio).

Agradeço imensamente a Profª Drª Sónia Mendo, minha orientadora durante o doutorado sanduíche (PDSE). Profª., muito obrigada por todos aprendizados, dedicação e confiança em mim. Você abriu as portas do LBM de coração aberto, fazendo com que os seis meses de experimentos voassem e eu não quisesse mais voltar para o Brasil. Obrigada por me permitir fazer parte deste grupo maravilhoso! Sempre permitindo expandir meu potencial acadêmico, fazendo com que eu constantemente pensasse profundamente sobre meu projeto, e o mais importante: mostrando uma profunda paixão pela Ciência! Foram seis meses muito importantes na minha vida acadêmica, profissional e pessoal. Parte desta tese deve-se a você e ao LBM! Muito obrigada, do fundo do coração.

Aos membros do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) da UA, em especial à Tânia, Diana, Joana Barbosa, Joana Lorenço, Ana Sofia e Inês. Todas vocês são muito especiais para mim, minhas amigas lindas! Nunca fiquei tão triste em ter que dizer um "até logo" como fiquei quando tive que partir. Agradeço todos os dias por ter conhecido pessoas tão incríveis como vocês!

Tâninha! Quem me ajudou imensamente nos experimentos, transmitindo todo seu conhecimento e inteligência. Obrigada por me acolher, por me ajudar, por me apoiar e doar seu conhecimento. Obrigada pelas risadas, conversas, desabafos e amizade! Te admiro muito amiga! Continue sempre essa pessoa linda de coração.

Joana Barbosa (Joanita) obrigada por toda sua amizade! Obrigada pela troca de conhecimentos, pelos aprendizados, pela amizade, risadas, cafés com natas! Obrigada por todos os momentos que passamos juntas.

Joana Lorenço, obrigada por todo apoio, conversas, risadas e amizade! Você foi como uma irmã mais velha para mim. Me acolheu de braços abertos. Obrigada!

Diana, o que falar sobre você minha amiga querida? Quantas aventuras, risadas, aprendizados... Você me acolheu completamente com todo o coração lindo, me colocando na sua vida e apresentando todos seus amigos. Em nenhum momento me deixou eu me sentir só. Aliás, você simplesmente me adotou como uma irmã! Amiga querida, não tenho palavras para expressar a gratidão que tenho por nossa amizade!

Aos amigos da Pós, especialmente Lúcia (Lu) e Jelena pelas risadas, companhia e aprendizados. Lu, obrigada por me mostrar perspectivas tão diferentes, obrigada pela amizade sincera, pelas aventuras (Bósnia! LOL), pelo esforço sem limites e conselhos! Jelena, minha amiga linda (cute, but psycho hahaha), obrigada por toda amizade sincera, pelos conselhos sinceros e sem filtro, pelo apoio incondicional, pelos choros e pelas risadas.

À Gabriela Tortorelli (Tchuca), minha amiga de infância, por toda a amizade sincera, cumplicidade, conselhos, risadas e amor, mesmo quando estamos fisicamente distantes. Tchuca, obrigada por ser uma irmã de coração!

À minha argentina favorita: Jésica (Chess)! Minha marida querida, obrigada pela amizade, conselhos sinceros, puxões de orelha, risadas, aventuras, caipirinhas no balde, conversas, desabafos... obrigada por ser minha amiga.

Aos meus amigos lindos e amados: Luciana (Lu) e Sven. Obrigada por toda amizade sincera, seja nos momentos bons ou nos ruins. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, por se preocuparem tanto comigo. Obrigada pelos vinhos no parque, pelas risadas, pelos abraços, pela diversão, pelos perrengues, pelos abraços. Obrigada por serem parte da minha vida.

À Tatiana (Tati) pela amizade sincera, companheirismo, risadas, choros, colos... Obrigada por ser minha amiga em todos os momentos.

Ao Gabriel (Gab), que por força do destino (ou de um algorítimo) cruzou com o meu caminho diversas vezes, incluindo projetos (Biota Araçá), até nos notarmos. Obrigada ser essa pessoa maravilhosa e obrigada por todo carinho, zelo, afeto e dedicação.

À minha família portuguesa, que me acolheu de braços abertos, cuidando de mim com tanto amor e carinho! Obrigada tia Rosalina, por cuidar de mim como uma mãe, me dando muito amor e carinho! Obrigada tio Cristiano por todo carinho, afeto, zelo e risadas.

Muito obrigada Bárbara (Babi), minha prima guerreira. Apesar de todos os desafios que você enfrenta, mantém a alegria e essa força imensa que te move! Obrigada por ser minha prima, você é um exemplo para mim!

À minha família brasileira. Obrigada tia Karen e Vó! Muito obrigada tia Jaqueline por me mostrar ao mundo acadêmico logo cedo, e me ensinar que minha formação deveria "ajudar os outros", independente da carreira que seguisse! Me levando com você nas minhas férias para a UFRGS e para a UFPE. Obrigada pela inspiração! À minha Bisa querida (*in memorian*) por todo amor incondicional.

Ao meu pai, por todo esforço em sempre dar a melhor educação para mim e minha irmã. Por nos ensinar a valorizar, lutar e conquistar nossos sonhos. E o mais importante, a nos ensinar a nunca desistir.

À minha irmã Larissa, por todo carinho, conversas, conselhos, risasdas, confissões, colos e amizade.

Aos meus cachorros: ao meu labrador, Link, que apareceu em uma quinta-feira chuvosa amarrado num poste e agora vive grudado em mim, me dando muito carinho e alegria. À Julie, a minha velhinha que, literalmente, me acompanhou em toda minha vida acadêmica: do início da graduação ao término do doutorado.

E por fim, a pessoa mais importante na minha vida: minha mãe, Maria Lucinda. Mamis, muito obrigada por acreditar em mim, por sempre me apoiar e incentivar a alcançar os meus sonhos. Obrigada por sempre torcer pelo meu sucesso e estar sempre ao meu lado. Obrigada por ser meu porto seguro, incluindo nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amor incondicional, amizade e cumplicidade. Te amo.

Não teria conseguido sem todos vocês! Por isso, dedico esta tese de todo meu coração a todos vocês! MUITO OBRIGADA!

“We do not need the magic to transform the world.
We carry all the power we need inside
ourselves already.”
(J.K. Rowling)

“Tudo vale a pena quando a alma não é pequena”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Ambientes costeiros apresentam elevados adensamentos populacionais, exercendo uma pressão seletiva, principalmente quando há a falta de estrutura sanitária adequada. Efluentes podem carrear bactérias patogênicas e antibióticos, gerando uma pressão seletiva aos microrganismos autóctones e criando resistomas. Desta forma, é importante o monitoramento de indicadores de contaminação, como *Escherichia coli e Enterococcus* sp. Além disto, faz-se importante o estudo dos mecanismos de resistência em áreas ambientais, uma vez que representam um sério risco à saúde pública global. O presente trabalho avaliou a diversidade e perfil de resistência de *Enterobacteriales* isolados de três áreas com diferentes níveis de contaminação: Praia da Fazenda (Ubatuba/SP), Baía do Araçá (São Sebastião/SP) and Ponta da Praia (Santos/SP).. Entre 2016 e 2018, foram coletadas amostras de água e sedimento para a avaliação da qualidade ambiental (densidades de *E. coli* e *Enterococcus* sp.) e diversidade de *Enterobacteriales*. As cepas de *Enterobacteriales* foram isoladas, purificadas e identificadas (bioquímica e molecular), e tiveram seu perfil de suceptibilidade avaliado para nove antibióticos, incluindo ertapenem (ERT), meropenem (MPM) e imipenem (IPM). Concomitantemente, as cepas resistentes à carbapenemicos (ERT, IPM e/ou MPM) foram avaliadas para verificar que mecanismo (enzimático ou proteínas da membrana externa) atuava em sua resistência. Os resultados apresentam que nos meses de verão, a Baía do Araçá e Ponta da Praia sofreram influência antrópica, apresentando densidades de *E. coli* e *Enterococcus* sp. acima da legislação permitida para água. Uma vez que não há nenhuma legislação específica para sedimento, as amostras de sedimento foram comparadas entre si e com relação aos limites apresentados para amostras de água. Tanto a Ponta da Praia, como a Baía do Araçá, apresentaram maiores densidades para as amostras de sedimento. Ambas apresentaram maiores densidades no verão, tanto para amostras de água, quanto para sedimento. Quanto a diversidade de espécies, a Baía do Araçá apresentou uma riqueza maior de espécies quando comparada com a Ponta da Praia. As amostras de Santos apresentaram uma maior abundância de bactérias patogênicas (*e.g. Klebisiella pneumoniae*), sendo um sério risco à saúde pública e economia local. Por fim, o perfil de suceptibilidade demonstrou que as cepas isoladas de Santos apresentam maior resistência aos antibióticos estudados. Foram detectadas 11 cepas que eram possíveis produtoras de carbapenemase. Contudo, após as análises moleculares, constatou-se que apresentavam mutações e/ou deleções em algumas *Omps*, conferindo assim resistência à carbapenêmicos. Em conclusão, pode-se verificar que a contaminação ambiental teve relação direta com o perfil de suceptibilidade das *Enterobacteriales* estudadas, bem como na sua diversidade. Entretanto, mais estudos fazem-se necessários para uma melhor avaliação de locais menos contaminados, e compreender a variação temporal a longo prazo da comunidade microbiana. O estudo também demonstrou a necessidade de políticas públicas mais rigorosas com relação à ambientes costeiros, especialmente com relação aos sedimentos.

PALAVRAS-CHAVE: qualidade microbiológica; balneabilidade; resistencia; *Enterobacteriaceae.*

ABSTRACT

Coastal environments have high population densities, exerting selective pressure, especially when there is a lack of sanitary structure. Effluents can carry pathogenic bacteria and antibiotics, generating a selective pressure on indigenous microorganisms, influencing on the creation of resistomas. Therefore, it is important to monitor contamination indicators, such as *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. In addition, it is important to study resistance mechanisms in environmental areas, since they represent a serious risk to global public health. The present work aimed to evaluate the diversity and resistance profile of *Enterobacteriales* isolated from three areas with different levels of contamination: Fazenda Beach (Ubatuba/SP), Araça Bay (São Sebastião/SP) and Ponta da Praia (Santos/SP). Between 2016 and 2018, water and sediment samples were collected to assess environmental quality (densities of *E. coli* and *Enterococcus* sp.) and diversity of *Enterobacteriales*. The *Enterobacteriales* strains were isolated, purified and identified (biochemical and molecular methods), and their susceptibility profile was evaluated for nine antibiotics, including ertapenem (ERT), meropenem (MPM) and imipenem (IPM). Concomitantly, strains resistant to carbapenems (ERT, IPM and / or MPM) were evaluated to verify which mechanism (enzyme or outer membrane proteins) acted on their resistance. The results demonstrated that in the summer, Araçá Bay and Ponta da Praia suffered anthropic influence, presenting densities of *E. coli* and *Enterococcus* sp. above the permitted water legislation. Since there is no specific legislation for sediment, these samples were compared among themselves and compared to the limits for water samples. Both Ponta da Praia and Araçá Bay showed higher densities for sediment samples, when compared to water samples. Regarding the diversity, the Araçá Bay presented a greater species richness when compared to Ponta da Praia. Santos showed a greater abundance of pathogenic bacteria (e.g. *Klebisiella pneumoniae*), being a serious risk to public health and the local economy. Finally, the susceptibility profile of Santos'isolates have greater resistance to the studied antibiotics, especially to carbapenems. Eleven strains that were possible producers of carbapenemase were detected. However, after molecular analysis, it was found that they had mutations and / or deletions in some *Omps*, thus conferring resistance to carbapenems. In conclusion, environmental contamination was directly related to the susceptibility profile of the studied *Enterobacteriales*, as well as their diversity. However, more studies are needed to understand the long-term temporal variation of the microbial community. The study also demonstrated the need for stricter public policies related to coastal environments, especially regarding sediments.

KEYWORDS: microbial quality; bathing; resistance; *Enterobacteriaceae.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama desenvolvido por Adeolu et al. (2016) demonstrando a nova classificação da ordem das *Enterobacteriales*. 19
Figura 2 - Esquema apresentando as diversas associações e aplicações do gênero *Pantoea* (Traduzido de WALTERSON & STAVRINIDES, 2015). 34
Figura 3 - Figura 3 – Classificação taxonômica de *B. diplopodorum*. (Lang et al., 2012)..... 45
Figura 4 – Linha do tempo correlacionando o ano de Aprovação/Lançamento de um antibiótico versus o ano de descoberta da primeira cepa resistente a determinado antibiótico. Adaptado de CDC (2018 e 2019).. 48
Figura 5 –Estruturas químicas dos quatro grupos pertencentes a classe dos β-lactâmicos, e ao lado exemplos de antibióticos de cada grupo. Penicilinas: amoxicilina; Cefalosporinas: Cefalexina; Carbapenêmicos: Imipenem; Monobactâmicos: Aztreonam. Adaptado de BUSH & MACIELAG (2010). 49
Figura 6 – Mecanismos primários de resistência à β-lactâmicos em *Enterobacteriales*. Estes mecanismos incluem: (i) inativação enzimática, codificada por genes presentes no plasmídeo e/ou cromossomo; (ii) diminuição da Adaptado de Nordmann et al. (2012).. 50
Figura 7 - Mecanismos gerais de A) Ser-β-lactamases, e B) metalo-β-lactamases (WRIGHT, 2005). 52
Figura 8 - Disseminação da resistência bacteriana entre humanos, agricultura e ambiente. Adaptado de CDC (2013). 53
Figura 9 - Mapa com a localização dos três locais de coleta: Santos (Ponta da Praia e Porto de Santos); São Sebastião (Baía do Araçá); Ubatuba (Praia da Fazenda).. 61
Figura 10 - Mapa da área de coleta na região da Baía de Santos. Em vermelho pontos de coleta (PP1 a PP5) 62
Figura 11 - Mapa da área da Baía do Araçá (São Sebastião/SP), localizada próxima ao Porto de São Sebastião e ao TEBAR. Pontos vermelhos representam os locais de coleta (S1–S5)..... 65
Figura 12 – Mapa da área de coleta Praia da Fazenda (Ubatuba/SP). Em vermelho, os pontos de coleta (U1 – U5) distribuídos ao longo da área de estudo..... 67
Figura 13 - Testes bioquímicos por meio de Painel para Enterobactérias (Probac®) para identificação das cepas isoladas. Cada poço demonstra um teste bioquímico para identificação de *Enterobacteriaceae*..... 70

Figura 14 – A e B: Fotografia do gel de agarose (1%), demonstrando bandas (~1360pb) como resultado da amplificação utilizando os primers 27F e 1492R, para a identificação molecular dos microrganimos isolados. Acima indicando o marcador de peso molecular (Marcador), as cepas isoladas e o controle negativo (C-). 73
Figura 15 – Esquema de placa utilizado para os testes de CIM. À esqueda, valores referentes a concentração do carbapenêmico utilizado (0 a 64 mg L-1). A última coluna representa os poços utilizados com a cepa controle (C+) E. coli ATCC 25922 e a concentração padrão, segundo BrCAST (2019). 75
Figura 16 – Desenho representando a técnica de disco sinergia IPM-EDTA. 76
Figura 17 – Figure 17 -Resultados obtidos para os três locais de coleta durante amostragens de verão e inverno. (A) Temperatura (ºC), (B) salinidade, (C) O.D e (D)pH. * Diferença estatística significativa (p<0,05). 81
Figura 18 - Densidade de *Enterococcus* spp. em amostras de Água e Sedimento, nas três áreas de estudo: Ubatuba (U), Baía do Araçá (A) e Santos (PP). *Linha vermelha indicando o limite (400 UFC mL-1), de acordo com a Resolução CONAMA 274/00, para amostras de água. 87
Figura 19 - Densidade de Escherichia coli em amostras de água e sedimento, nas três áreas de amostragem: Praia da Fazenda (U), Baía do Araçá (A) e Santos (PP). *Linha vermelha indicando o limite (2000 UFC mL-1), de acordo com a Resolução CONAMA 274/00, para amostras de água.. 88
Figura 20 - Densidades de Enterobacteriaceae obtidas durante o estudo, em amostras de água (UFC 100mL-1) e sedimento (UFC g-1), nos três locais de coleta: Santos (PP), Baía do Araçá (A) e Praia da Fazenda (U). 93
Figura 21 - Distribuição das espécies de Enterobacteriales nas áreas da Baía do Araçá (São Sebastião/SP) e Ponta da Praia (Santos/SP) 97
Figura 22 - Resultados da análise de PCA, correlacionando as bactérias isoladas com os locais de coleta 99
Figura 23 - Imagem mostrando, em vermelho, a mutação entre as posições 145 e 149. As 3 primeiras sequências são de genes OmpK35 obtidos no Genebank (NCBI) e a cepa K. pneumoniae é a 4ª sequência. 107
Figura 24 - A) Placa de Ágar MacConkey com crescimento de colônias (Amostra de água coletada em Santos). B) Placa de Ágar MacConkey com crescimento de colônias (Amostra de água

coletada na Baía do Araçá). C) Isolamentos sucessivos das colônias, afim de obter-se colônias puras. D) Colônia pura de *E. coli* isolada apartir de amostra de água da área de Santos..... 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características fenotípicas para a diferenciação de bactérias do gênero *Citrobacter*. -: 0% a 10% de positivas; (-): 10% a 20% de positivas; v: 20% a 80% de positivas; (+): 80% a 90% de positivas; +: 90% a 100% de positivas. (Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014)..... 23

Tabela 2 - Características fenotípicas para a diferenciação de bactérias do gênero *Enterobacter*. -: 0% a 10% de positivas; (-): 10% a 20% de positivas; v: 20% a 80% de positivas; (+): 80% a 90% de positivas; +: 90% a 100% de positivas. (Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014)..... 26

Tabela 3 - Testes bioquímicos para a diferenciação de espécies do gênero *Escherichia*. +: de 85% a 100% das cepas positivas; (+): de 50 a 80% das cepas positivas; (-): de 50 a 80% das cepas negativas; -: de 85% a 100% das cepas negativas (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014) 28

Tabela 4 - Testes bioquímicos para a diferenciação de espécies do gênero *Escherichia*. +: de 85% a 100% das cepas positivas; (+): de 50 a 80% das cepas positivas; (-): de 50 a 80% das cepas negativas; -: de 85% a 100% das cepas negativas (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014) 28

Tabela 5 - Diferenciação bioquímica das diferentes espécies de *Klebsiella*. +: de 85% a 100% das cepas positivas; (+): de 50 a 80% das cepas positivas; (-): de 50 a 80% das cepas negativas; -: de 85% a 100% das cepas negativas (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014)..... 28

Tabela 6 - Testes bioquímicos para a diferenciação fenotípica de bactérias do gênero *Pantoea*. +: 90 a 100% de positividade entre 24-48h; (+) 90 a 100% de positividade entre 1 e 4 dias; -: negativa; d: de 11 a 89% das cepas positivas entre 1 e 4 dias; (d): 11-89% de positividade entre 3 e 4 dias; ND: não determinado. Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014. 35

Tabela 7 - Lista de testes bioquímicos para a diferenciação de bactérias do gênero *Serratia*. +: positivo; -: negativo; F: fraco; ND: não determinado. Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014. 39

Tabela 8 - Diferenciação bioquímica das diferentes espécies do gênero *Proteus* (Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). 42

Tabela 9 - Teste bioquímicos para diferenciar as nove espécies de Providencia spp. +: positivo; -: negativo; SD: sem dados. Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014 e KHUNTHOPAN et al., 2014. 43

Tabela 10 - Diferenças bioquímicas entre Budvicia aquática e Budvicia dipoplodorum. +: positivo; -: negativo. Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014. 45

Tabela 11 - Pontos georreferenciados dos locais de coleta.. 61
Tabela 12 - Dados obtidos para temperature (Temp.), pH, salinidade, oxigênio dissolvido (O.D.), profundidade (Prof.) e matéria orgânica (M.O.), nas áreas de estudo..... 84
Tabela 13 - Densidades de *Enterococcus* spp. obtidas nas coletas de Verão e Inverno, para amostras de água e sedimento na área de estudo de Santos. 89
Tabela 14 - Densidades de *Escherichia coli* obtidas nas coletas de Verão e Inverno, para amostras de água e sedimento na área de estudo de Santos 90
Tabela 15 - Densidades de *Enterococcus* spp. obtidas nas coletas de verão e inverno, para amostras de água e sedimento na Baía do Araçá (São Sebastião/SP) 91
Tabela 16 - Densidade de *Escherichia coli*. detectados pela Técnica de Membrana Filtrante em amostras de água e sedimento, coletados na Baía do Araçá (São Sebastião/SP). 91
Tabela 17 - Densidade de *Escherichia coli*. detectados pela Técnica de Membrana Filtrante em amostras de água e sedimento, coletados na Praia da Fazenda (Ubatuba/SP) 92
Tabela 18 - Densidade de *Enterococcus* sp. detectados pela Técnica de Membrana Filtrante em amostras de água e sedimento, coletados na Praia da Fazenda (Ubatuba/SP) 92
Tabela 19 - - Densidades de *Enterobacteriales* encontradas durante o verão, nas áreas da Baía do Araçá (A) e Santos (PP). 95
Tabela 20 - Densidades de *Enterobacteriales* encontradas durante o inverno, nas áreas da Baía do Araçá (A) e Santos (PP) 96
Tabela 21 - Total de isolados (n=158) na área na Baía do Araçá, durante todo o período de estudo, e a porcentagem de cepas resistentes (n). FOS: fosfomicina; ETP: ertapenem; MPM: meropenem; IPM: imipenem; TET: tetraciclina; AMC: amoxicilina + ácido clavulânico; GEN: gentamicina; CRO: ceftriaxona; NOR: norfloxacino. (*) Breakpoints utilizado baseado no CLSI (2019), uma vez que o BrCAST (2019) não contempla o antibiótico 101
Tabela 22 - Total de isolados (n=188) na área de Santos, durante todo o período de estudo, e a porcentagem de cepas resistentes (n). 102
Tabela 23 - Isolados positivos para o teste de disco sinergia IPM-EDTA. 104
Tabela 24 - Suceptibilidade das cepas IPM-EDTA positivas, testadas por meio de disco-difusão, de acordo com a normative BrCAST (2019). 105
Tabela 25 - Suceptibilidade a carbapenêmicos testada por meio da técnica de Concentração Mínima Inibitória (CIM). 106

Tabela 26 - Presença (+) ou ausência (-) das *Omps* estudadas nas cepas IPM-EDTA positivas. (*) indica a presença de mutações..... 106

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1. Enterobacteriales 18
2.1.1. Família Enterobacteriaceae 20
2.1.1.1. Citrobacter sp. 20
2.1.1.2. Enterobacter sp. 24
2.1.1.3. Escherichia sp. 27
2.1.1.4. Klebsiella sp. 29
2.1.1.5. Raoutella sp. 31
2.1.2. Família Erwiniaceae 33
2.1.2.1. Pantoea sp. 33
2.1.3. Família Pectobacteriaceae 36
2.1.4. Família Yersiniaceae 36
2.1.4.1. Serratia sp. 37
2.1.4.2. Rahnella sp. 39
2.1.5. Família Hafniaceae 40
2.1.6. Família Morganellaceae 40
2.1.6.1. Proteus sp. 41
2.1.6.2. Providencia sp. 42
2.1.7. Família Budviciaceae 43
2.1.7.1. Budvicia sp. 44
2.1.7.2. Leminorella sp. 46
2.2. Resistência bacteriana 47
2.3. Contaminação ambiental 55
3. OBJETIVOS 60
4. MATERIAL E MÉTODOS 61
4.1. Área de estudo 61
4.1.1. Ponta da Praia de Santos (Santos/SP) 62
4.1.2. Baía do Araçá (São Sebastião) 64
4.1.3. Praia da Fazenda (Ubatuba/SP) 66
4.2. Coleta e Processamento 67
4.2.1. Dados Físico-Químicos 68
4.3. Qualidade Microbiológica 68
4.3.1. Escherichia coli 68
4.3.2. Enterococcus spp 69
4.4. Enteriobacteriales 69
4.4.1. Contagem, Isolamento e Purificação 69

4.4.2. Identificação 70
4.4.2.1. Identificação bioquímica 70
4.4.2.2. Identificação Molecular 71
4.5. Teste de Suceptibilidade 73
5.5.1. Teste de Disco-Difusão (Kirby-Bauer) 73
5.5.2. Concentração Mínima Inibitória (CIM) 74
5.5.3. Identificação de genes de resistência (Metalo β-lactamases) 75
4.5.3.1. Screening 75
4.5.3.2. Genes de resistência para metalo β-lactamases 76
4.5.3.3. Genes de resistência para as demais β-lactamases 77
4.5.3.4. Análise das Proteínas da Membrana Externa bacteriana (Omps) 78
4.6. Diversidade bacteriana e análises estatísticas 79
5. RESULTADOS 81
5.1. Contaminação Ambiental 81
5.1.1. Dados Físico-Químicos 81
5.1.1.1. Ponta da Praia de Santos (Santos/SP) 83
5.1.1.2. Baía do Araçá (São Sebastião/SP) 85
5.1.1.3. Praia da Fazenda (Ubatuba/SP) 86
5.1.2. Qualidade Microbiológica 87
5.1.2.1. Ponta da Praia de Santos (Santos/SP) 89
5.1.2.2. Baía do Araçá (São Sebastião/SP) 90
5.1.2.3. Praia da Fazenda (Ubatuba/SP) 92
5.2. Enterobacteriales 93
5.2.1. Diversidade 93
5.2.2. Suceptibilidade 100
5.2.2.1. Teste de Disco-Difusão 100
5.2.2.2. Cepas IPM-EDTA positivas 103
5.2.2.3. Concentração Mínima Inibitória (CIM) 104
5.2.2.4. Análises de genes de resistência e proteínas da membrana externa (Omps) 106
6. DISCUSSÃO 109
7. CONCLUSÃO 114
8. REFERÊNCIAS 115
ANEXO I i
ANEXO II iv
ANEXO III vi

1. INTRODUÇÃO

Segundo definição da Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar de 1982, poluição é a introdução, pelo homem, direta ou indiretamente, de substâncias ou energia no ambiente marinho, que podem resultar em efeitos deletérios (*e.g.* queda na qualidade da água; danos aos recursos e à vida marinha, incluindo a pesca.). Entretanto, devido às lacunas no conhecimento sobre contamicação costeira e oceânica, t6em dificultado a implementação efetiva do gerenciamento da poluição marinha (ISLAM & TANAKA, 2004).

Ecossistemas marinhos e estuarinos apresentam grande importância socioeconômica devido aos seus possíveis usos (*e.g.* pesca e turismo) e elevada importância ambiental, sendo de suma importância a qualidade da água e do sedimento destes locais (OLIVEIRA, 2009; ALMEIDA et al., 2012). Entretanto, estas regiões apresentam grandes concentrações humanas, como, por exemplo, no Brasil, onde cerca de 70% da população situa-se na região costeira (IBAMA, 1993; FAGUNDES et al., 2007). Muitas áreas costeiras ao redor do mundo, têm sofrido danos por causa da poluição, afetando significativamente a pesca e o comércio nestas áreas. Portanto, o controle da poluição aquática deve ser considerado como primeira necessidade, para a conservação ambiental e dos recursos aquáticos (ISLAM & TANAKA, 2004).

A ocupação humana das regiões costeiras é a causa de diversos impactos ambientais, como por exemplo descarga de efluentes nos corpos hídricos, muitas vezes sem tratamento prévio (DALFIOR, 2005; BURUEM et al., 2013). Esgotos domésticos dispostos em regiões costeiras podem carrear diversos microrganismos patogênicos, como bactérias, vírus e protozoários, além de compostos químicos, tais como antibióticos e metais pesados, expondo os usuários destas áreas ao risco de contrair diversas doenças (OLIVEIRI 1982; WHO, 1998; HIRSCH, 1999; ISLAM & TANAKA, 2004).

Além do impacto gerado pela disposição indevida de efluentes, o aumento da população nas regiões costeiras durante o verão eleva a descarga orgânica nos corpos d'água e, consequentemente, altera a composição qualitativa e quantitativa de microrganismos, entre eles os patogênicos (PIANETTI et al., 2004; SATO et al., 2005; OLIVEIRA & PINHATA, 2008, OLIVEIRA et al., 2009). Quando estes patógenos atingem as águas e areias de praias e regiões costeiras, expõem os banhistas a possibilidade de contrair várias doenças, entretanto a incidência destas doenças depende de uma variedade de fatores, tais como os níveis de poluição na água ou areia, a natureza e tempo de exposição; e as condições do sistema imune do banhista (BARTRAM & REES, 2000). No caso das areias de praias e sedimentos, estes mostram-se ambientes mais favoráveis às bactérias, uma vez que apresentam proteção contra a luz solar, nutrientes e proteção contra predadores (ANDRADE et al., 2015; PIANETTI et al., 2004; DAVIES & BAVOR, 2000; DAVIES-COLLEY et al., 1999; VILLAR et al., 1999; DAVIES et al., 1995; SINTON et al., 1994), porém nenhuma legislação vigente faz a regulamentação da qualidade deste compartimento ambiental.

Diversos estudos demonstraram concentrações de microrganismos, incluindo bactérias patogênicas, mais elevadas em amostras de areia e sedimentos do que na coluna d'água (ANDRADE et al., 2015; WHITMAN et al., 2014; OLIVEIRA & PINHATA, 2008; MUDRYK, 2005; ALM et al., 2003; WHITMAN & NEVERS, 2003; PAPADAKIS et al., 1997). Entretanto, os organismos patogênicos, oriundos de esgotos, principalmente domésticos, não afetam apenas os humanos, mas também organismos marinhos. Segundo pesquisa de Grillo, et al. (2001), diversos mamíferos marinhos (*e.g.* cetáceos e pinípedes) apresentaram contaminações por patógenos humanos, sendo principalmente afetados por bactérias da ordem *Enterobacteriales*. Além disso, também pode afetar diretamente recursos pesqueiros, como bivalves, uma vez que são organismos filtradores e podem

concentrar elevadas densidades de compostos químicos e microrganismos em seus tecidos, incluindo patógenos (DAME, 1996; MIGNANI et al., 2013).

Locais onde a coleta e o tratamento de esgoto são inficientes, precários ou até mesmo inexistente, são extremamente suceptíveis à elevação da concentração de microrganismos, incluindo organismos patogênicos, sendo assim, a qualidade da água deste ambiente é fundamental para que seus usos não acarretem prejuízos ao meio ambiente e à saúde da população (OLIVEIRA, 2009). Entretanto, a legislação brasileira referente a qualidade microbiológica de águas recreacionais (balneabilidade), Resolução CONAMA nº 274 (Brasil, 2000), prevê apenas os padrões microbiológicos para águas recreacionais, através da análise de indicadores de contaminação fecal, sendo eles: coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Enterococcus*. É sabido que as bactérias do grupo *Enterococcus*, são mais tolerantes à diferentes condições ambientais, como salinidade, baixo pH e outras variáveis, sendo reconhecidas como melhores indicadores de qualidade de águas marinhas (CABELLI, 1983; INGHAN et al., 2000; HANCOCK & GILMORE, 2006).

Apesar de diversos estudos com relação à qualidade das águas recreacionais, há um déficit com relação ao número de trabalhos relacionados à qualidade dos sedimentos encontrados em praias. É de suma importância a comparação desde dois compartimentos, água do mar e sedimentos de praia, uma vez que diversos estudos comprovaram que há uma maior concentração de microrganismos nos sedimentos, local onde os banhistas passam a maior parte do tempo (MENDES et al., 1993; PAPADAKIS et al., 1997; MUDRYK, 2005; OLIVEIRA & PINHATA, 2008; WHITMAN et al., 2014; ANDRADE et al., 2015).

Além de sedimentos serem locais mais propícios ao crescimento microbiano, a legislação brasileira não prevê padrões, nem limites para a qualidade microbiológica deste

compartimento, o que é de extrema importância para a balneabilidade de uma praia e assegurar a qualidade ambiental deste local.

Comumente, os organismos utilizados para a análise de balneabilidade de corpos hídricos, são bactérias de origem entérica, na sua maioria *Enterobacteriales*. Porém, a detecção de microrganismos, especialmente patogênicos, no ambiente, é limitada, difícil e onerosa. Por isto, são utilizados indicadores (*e. g. Escherichia coli*), que permitem facilmente detectar a presença de contaminação fecal recente e podem indicar o risco da presença de microrganismos patogênicos (FIELD & SAMADPOUR, 2007; SAMPAIO, 2010). Todavia, segundo o indicador fecal deve estar correlacionado com a presença do patógeno, devendo ter um perfil de sobrevivência semelhante ao do patógeno, o que muitas das vezes não é possível, como no caso da *Escherichia coli* (indicador) e da *Salmonella* spp. (patógeno) (LEMARCHAND & LEBARON, 2003; FIELD & SAMADPOUR, 2007).

A contaminação por microrganismos, principalmente por bactérias, acarreta em sérios riscos ao ambiente, aos recursos, à vida marinha e à saúde pública. Sendo assim, faz-se necessária a identificação dos enteropatógenos nas águas e sedimentos de praias, uma vez que representam recursos hídricos (ALMEIDA et al., 2012). Apesar do uso de indicadores de contaminação fecal para avaliar a qualidade ambiental e a balneabilidade, a detecção e avaliação dos demais microrganismos patogénicos no ambiente é extremamente importante (SAMPAIO, 2010), uma vez, que aparecem intermitantemente no meio ambiente e em baixas densidades (SAVICHTCHEVA & OKABE, 2006). Além disto, na sua grande maioria, estes patógenos são ignorados pelos órgãos fiscalizadores e são potencialmente perigosos ao ecossistema, recursos pesqueiros e à vida marinha local.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Enterobacteriales*

Descrita inicialmente por Rahn (1937), a família das *Enterobacteriaceae* (ordem *Enterobacteriales*) é a mais extensivamente estudada e apresenta algumas espécies patógenas para humanos, animais e plantas, que podem afetar economicamente diversas atividades (FRANCINO et al., 2006; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014; MORALES-LÓPEZ et al., 2019). Anteriormente, a ordem *Enterobacteriales* contava apenas com uma única família, a *Enterobacteriaceae*. Entretanto, recentemente, devido aos avanços nas técnicas moleculares de identificação, novas famílias foram propostas para a ordem *Enterobacteriales*: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yerniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* e *Budviciaceae* (ADEOLU et al., 2016) (Figura 1).

A ordem *Enterobacteriales*, apresenta mais de 60 gêneros e mais de 250 espécies publicadas (ALNAJAR & GUPTA, 2017). Caracterizam-se por serem bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, sem a formação de esporos e pertencem a classe de Proteobactérias (FRANCINO et al., 2006; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014; ADEOLU et al., 2016; MORALES-LÓPEZ et al., 2019). São bactérias que estão presentes nos mais diversos ambientes, tais como solos, águas, em associação com animais e plantas (FRANCINO et al., 2006). Devido à algumas espécies patogênicas importantes, a ordem recebe grande atenção dos pesquisadores, especialmente na área de Microbiologia Clínica. Contudo, estes microrganismos patogênicos não se restringem aos seus hospedeiros, podendo ser encontrados no ambiente, sendo de suma importância o estudo desta ordem pelas diversas áreas da Microbiologia.

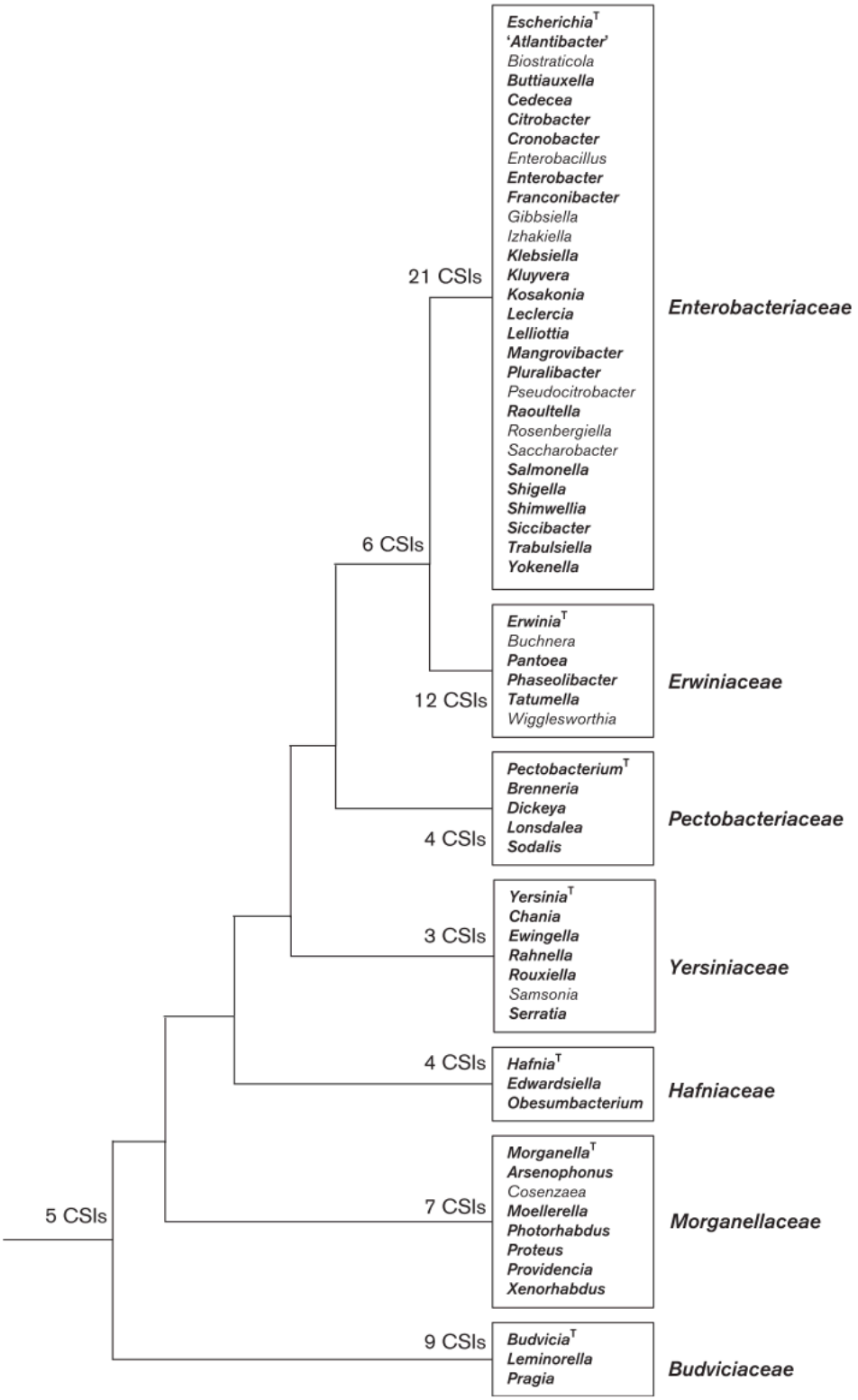

Figura 1 – Diagrama desenvolvido por Adeolu et al. (2016) demonstrando a nova classificação da ordem *Enterobacteriales.* CSI: "conserved signature insertion/deletion"

2.1.1. Família *Enterobacteriaceae*

Maior e mais bem estudada família da ordem *Enterobacteriales*. É composta por 29 gêneros (ADEOLU et al., 2016), entretanto, anteriormente, era composta por mais de 60 gêneros, uma vez que era a única família pertencente a ordem *Enterobacteriales* (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Dentre os 29 gêneros, podemos destacar *Citrobacter* (WERKMAN & GILLEN, 1932), *Enterobacter* (RAHN, 1937), *Klebsiella* (DRANCOURT et al., 2001), *Salmonella* (LIGNIERES, 1900), *Shigella* (CASTELLANI & CHALMERS, 1919) e, o gênero mais conhecido e bem estudado, *Escherichia* (CASTELLANI & CHALMERS, 1919; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014; ADEOLU et al., 2016; MORALES-LÓPEZ et al., 2019). Além dos gêneros conhecidos, recentemente, novos gêneros foram descobertos como *Atlantibacter* (HATA et al., 2016) e *Kosakonia* (BRADY et al., 2011; MORALES-LÓPEZ et al., 2019). Com base em análises moleculares e filogenéticas (genomas e múltiplos genes), Adeolu et al. (2016) agrupou estes gêneros em um cluster monofilético, devido a 21 assinaturas conservadas em proteínas, incluindo enzimas importantes para o metabolismo bacteriano. Todas bactérias desta família são catalase positivas e oxidase negativas. Encontram-se distribuídas pelos mais diversos habitats, desde amostras de solo e água, até humanos (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014; RIBEIRO et al., 2017).

2.1.1.1. *Citrobacter* spp.

O gênero foi descrito pela primeira vez por Werkman & Gillen (1932), e compreende até o momento 14 espécies: *C. freundii* (WERKMAN & GILLEN, 1932)*, C. koseri* (BRENNER et al., 1999)*, C. amalonaticus* (YOUNG et al., 1971)*, C. farmeri* (BRENNER et al., 1999)*, C. youngae* (BRENNER et al., 1999)*, C. braakii* (BRENNER et al., 1998)*, C. werkmanii* (BRENNER et al., 1999)*, C. sedlakii* (BRENNER et al., 1999)*,*

C. rodentium (BORENSHTEIN & SCHAUER, 2006)*, C. gillenii* (BRENNER et al., 1999), *C. murliniae* (BRENNER et al., 1999), *C. europaeus* (RIBEIRO et al., 2017), *C. pasteurii* (CLERMONT et al., 2015), *C. portucalensis* (RIBEIRO et al., 2017).

As bactérias deste gênero apresentam flagelos, que permitem a motilidade destes microrganismos. Ademais, são bactérias que são negativas para o teste de Voges-Proskauer, fenilanina desaminase e lisina descarboxilase, enquanto que são positivas para indol, vermelho de metil e podem utilizar citrato como fonte de carbono. (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). As principais diferenças bioquímicas entre as espécies deste gênero são apresentadas na Tabela 1. Além da reclassificação realizada por Adeolu et al. (2016), podemos observar, por meio de análises moleculares de 16S rRNA (WARREN et al., 2000; CLERMONT et al., 2015) a subdivisão do gênero *Citrobacter* em três grupos distintos: grupo I (*C. freudii*, *C. youngae*, *C. braakii, C. werkmanii, C. gillenii* e *C. murliniae*), grupo II (*C. amalonaticus, C. farmeri, C. sedlakii* e *C. rodentium*) e grupo III (*C. koseri*).

As espécies deste gênero podem ser encontradas em uma grande variedade de hábitats (BORENSHTEIN & SCHAUER, 2006), porém algumas espécies podem ser patógenas oportunistas e estão associados com diversas infecções em humanos (SAMONIS et al., 2009; CHOWDHRY & COHEN, 2012; CLERMONT et al., 2015).

No caso de *C. freudii*, é encontrado principalmente em água do mar, alimentos, animais (*e.g.* mamíferos, aves) e também pode ser encontrado em efluentes (TORANZO et al., 1994; MERUVU & DONTHIREDDY, 2013; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Esta espécie pode ser um patógeno oportunista, podendo causar diversas infecções em humanos (DRELICHMAN & BAND, 1985; WHALEN et al., 2007; CHEN & JI, 2018; LALAOUI et al., 2019), ou até mesmo em peixes, comprometendo assim a pesca e/ou

aquicultura (TORANZO et al., 1994; SVETLANA et al., 2003; APUN et al., 2010; GU et al., 2019; SAMUEL et al., 2019).

A espécie *C. koseri* é parte da microbiota intestinal de diversos animais, incluindo humanos (PARTE, 2014; EKWANZALA et al., 2020), porém também podem ser patógenos secundários e causar infecções em humanos (GROSS et al., 1973; GROSS & ROWE, 1983; UNDERWOOD & AVISON, 2004; ANDO et al., 2019; YUAN et al., 2019; LEE et al., 2020). Cepas patogênicas, que apresentavam genes de resistência a carbapenêmicos já foram isoladas de esgotos (EKWANZALA et al., 2020), mas também já foram isoladas cepas resistentes de lençóis freáticos (WU et al., 2019), o que representa um sério risco à saúde pública e à economia.

Já as espécies *C. europaeus, C. portucalensis* e *C. pasteurii*, são as espécies descritas mais recentemente, apresentando poucas publicações envolvendo-as. São bactérias naturais da microbiota intestinal de humanos e outros animais, porém também podem ser patógenos oportunistas (CLEREMONT et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017a; RIBEIRO et al., 2017b). Há alguns relatos de cepas multirresistentes (RIBEIRO et al., 2017a; IGBINOSA et al., 2018; HASAN et al., 2019), podendo representar uma preocupação para a saúde pública.

Tabela 1 – Características fenotípicas para a diferenciação de bactérias do gênero *Citrobacter*. -: 0% a 10% de positivas; (-): 10% a 20% de positivas; v: 20% a 80% de positivas; (+): 80% a 90% de positivas; +: 90% a 100% de positivas. (Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014)

Reação	***C. freudii***	***C. koseri***	***C. amalonaticus***	***C. youngae***	***C. braakii***	***C. werkmanii***	***C. sedlakii***	***C. farmeri***	***C. rodentium***	***C. gillenii***	***C. murliniae***
Indol	(-)	+	+	(-)	v	-	+	+	-	-	+
Citrato de Simmons	+	+	+	+	(+)	+	+	v	v	+	+
Produção de H_2S	v	-	(-)	(+)	v	+	-	-	-	(+)	v
Urease	v	v	+	v	v	+	+	v	+	-	v
Arginina desaminase	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	(+)
Descarboxilase de ornitina	(-)	+	+	-	(+)	-	+	+	+	-	-
Motilidade	(+)	+	+	+	v	+	+	+	v	(+)	+
KCN	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Malonato	(-)	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
D-Glicose (gás)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
Produção de ácido a partir de:											
Lactose	+	(+)	+	(+)	(+)	v	+	+	+	(+)	+
Sacarose	v	v	-	v	(-)	-	-	+	-	(-)	v
Dulcitol	v	v	-	v	v	-	+	-	-	-	+
Salicina	(-)	(+)	+	-	-	-	v	+	+	v	v
Rafinose	(+)	-	-	-	v	-	-	+	-	(-)	(-)
Celobiose	(+)	+	+	v	+	(+)	+	+	+	(+)	+
α-CH_3-glucosídeo	v	(+)	(-)	-	v	-	-	+	-	-	-
Esculina	(-)	v	v	-	-	-	v	v	(+)	v	+
Melibiose	+	-	-	-	+	-	+	+	-	(+)	v
Glicerol	+	+	v	+	+	+	(+)	v	v	(+)	+
Acetato de sódio	(+)	+	+	(+)	v	+	(+)	+	v	(-)	+
Redução de nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+

2.1.1.2. Enterobacter spp.

Hormaeche & Edwards (1960) descreveram pela primeira vez o gênero *Enterobacter*, e apresenta 36 espécies, além de cinco subespécies (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014; PARTE, 2014): *E. aerogenes* (HORMAECHE & EDWARDS, 1960), *E. amnigenus* (IZARD et al., 1981), *E. arachidis* (MADHAIYAN et al., 2010), *E. asburiae* (BRENNER et al., 1988), *E. bugandensis* (DOIJAD et al., 2016), *E. cancerogenus* (UROSEVIC, 1966), *E. cloacae* subsp. *cloacae* (JORDAN, 1890; HORMAECHE & EDWARDS, 1960; HOFFMANN et al., 2005a), *E. cloacae* subsp. *dissolvens* (ROSEN, 1922; HOFFMANN et al., 2005a), *E. gergoviae* (BRENNER et al., 1980), *E. helveticus* (STEPHAN et al., 2007), *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (HOFFMANN et al., 2005b), *E. hormaechei* subsp. *oharae* (HOFFMANN et al., 2005b), *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* (HOFFMANN et al., 2005b), *E. intermedius* (IZARD et al., 1980), *E. kobei* (HOFFMANN et al., 2005a), *E. ludwigii* (HOFFMANN et al., 2005c), *E. massiliensis* (LAGIER et al., 2013), *E. mori* (ZHU et al., 2011), *E. muelleri* (KAMPFER et al., 2005), *E. nimipressuralis* (BRENNER et al., 1988), *E. oryzae* (PENG et al., 2009), *E. oryzendophyticus* (HARDOIM et al., 2015), *E. oryziphilus* (HARDOIM et al., 2015), *E. pulveris* (STEPHAN et al., 2008), *E. pyrinus* (CHUNG et al., 1993), *E. sacchari* (ZHU et al., 2013), *E. sakazakii* (FARMER et al., 1980), *E. siamensis* (KHUNTHONGPAN et al., 2014), *E. soli* (MANTER et al., 2011), *E. tabaci* (DUAN et al., 2016), *E. taylorae* (FARMER et al., 1985), *E. turicensis* (STEPHAN et al., 2007) e *E. xiangfangensis* (GU et al., 2014).

As principais características deste grupo são a produção de ácido e gás a partir de glicose e lactose, positivas para Voges-Proskauer, negativas para a produção de H_2S, fenilalanina desaminase e o teste de vermelho de metil (TEIXEIRA & MERQUIOR,

2014). As principais características para diferenciar as principais espécies deste gênero estão descritas na Tabela 2.

Como a *Escherichia coli*, as bactérias do grupo *Enterobacter*, são coliformes termotolerantes, associadas ao trato gastrointestinal de mamíferos e aves (DAUGA & BREEUWER, 2008; DAVIN-REGLI et al., 2019). Contudo, também podem ser encontrados em amostras de solo e água (WU et al., 2018; DAVIN-REGLI et al., 2019). Podem ser patógenos oportunistas, especialmente a espécie *E. sakazakii* (NAZAROWEC & FARBER, 1997; IVERSEN et al., 2007; DAUGA & BREEUWER, 2008; DAVIN-REGLI et al., 2019).

Por ser um microrganismo associado ao trato gastrointestinal de animais homeotermos diversos, especialmente mamíferos, associa-se a presença de determinadas espécies nos ambientes como contaminantes, sendo o grupo dos coliformes termotolerantes muito utilizado para medir a qualidade ambiental, especialmente de ambientes costeiros (CHAN et al., 1979; CONAMA, 2000; DAVIN-REGLI et al., 2019). Assim, diversas pesquisas ao longo dos anos detectaram a presença de *Enterobacter* em ambientes costeiros, incluindo cepas multirresistentes, podendo contaminar, inclusive, alimentos de origem marinha (KERRY, 1990; PATEL et al., 2016; MADEC et al., 2017; VU et al., 2018).

Tabela 2 – Características fenotípicas para a diferenciação de bactérias do gênero *Enterobacter*. -: 0% a 10% de positivas; (-): 10% a 20% de positivas; v: 20% a 80% de positivas; (+): 80% a 90% de positivas; +: 90% a 100% de positivas. (Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014)

Reação	***E. aerogenes***	***E. amnigenus***	***E. arachidis***	***E. asburiae***	***E. bugandensis***	***E. cancerogenus***	***E. cloacae* subsp. *cloacae***	***E. cloacae* subsp. *dissolvens***	***E. gergoviae***	***E. helveticus***	***E. hormaechei***	***E. kobei***	***E. ludwigii***	***E. mori***	***E. nimipressuralis***	***E. oryzae***	***E. pulveris***	***E. pyrinus***	***E. solis***	***E. turicensis***
Hidrólise de aesculina	+	+	-	+		+	v	+	+	+	-	-	(-)	+	+	-	+	+	ND	+
Arginina dihidrolase	-	v	+	v		+	+	+	-	-	v	+	+	+	(-)	+	-	-	+	-
Descarboxilase da lisina	+	-	-	-		-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
Vermelho de metil	-	v	-	+		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	ND	+
Motilidade	+	+	+	v		+	+	(-)	+	+	v	(+)	+	+	-	+	+	v	+	+
Descarboxilase da ornitina	+	v	+	+		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	(+)	-
Utilização de:																				
1-O-Metil-α-galactopiranosida	(+)	+	+	(+)		-	+	+	+	+	-	+	+	v	-	ND	+	-	ND	+
Citrato	+	+	+	+		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
D-Arabitol	+	-	+	-		-	v	-	+	-	(-)	-	-	+	-	-	+	-	ND	-
D-Sorbitol	+	v	+	+		-	+	+	-	-	(-)	+	+	+	+	+	-	-	+	-
L-Fucose	-	-	+	-		+	-	v	v	-	+	-	v	v	-	+	-	-	ND	-
Melibiose	+	+	-	-		-	(+)	+	+	+	(-)	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Muco	+	v	-	v		+	v	+	-	+	+	v	+	+	(+)	+	+		ND	+
Putrescina	v	-	-	(-)		+	+	+	v	+	-	v	-	+	-	-	-	+	ND	-
Sacarose	+	v	+	+		-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	ND	-
α-Ramnose	+	+	+	(+)		+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Apesar de apresentar espécies descritas há mais de 50 anos, o gênero *Enterobacter* apresenta algumas espécies descritas recentemente como a *E. bugandensis*. Mesmo com a recente descrição, *E. bugandensis* apresenta um sério risco para a saúde pública, uma vez que já foram reportadas cepas resistentes e que afetaram humanos (DOIJAD et al., 2016; DAVIN-REGLI et al., 2019). Deve-se mencionar, que o risco é maior, uma vez que estas bactérias podem colonizar os mais diversos habitats.

2.1.1.3. *Escherichia* spp.

O gênero *Escherichia* é o mais amplamente estudado de todas as bactérias, possuindo oito espécies descritas: *E. adecarboxylata* (LECLERC, 1962), *E. albertii* (HUYS et al., 2003), *E. blattae* (BURGESS et al., 1973), *E. coli* (CASTELLANI & CHALMERS, 1919), *E. fergusonii* (FARMER et al., 1985), *E. hermannii* (BRENNER et al., 1982a), *E. marmotae* (LIU et al., 2015) e *E. vulneris* (BRENNER et al., 1982b). A Tabela 3 apresenta os testes bioquímicos para a diferenciação das espécies de *Escherichia* spp.

Tabela 3 – Testes bioquímicos para a diferenciação de espécies do gênero *Escherichia*. +: de 85% a 100% das cepas positivas; (+): de 50 a 80% das cepas positivas; (-): de 50 a 80% das cepas negativas; -: de 85% a 100% das cepas negativas (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014).

Reação	***E. albertii***	***E. coli***	***E. fergusonii***	***E. hermanii***	***E. vulneris***
Indol	-	+	+	+	-
Lisina	+	+	+	-	+
Ornitina	+	(+)	+	+	-
Crescimento em KCN	-	-	-	+	-
Fermentação de:					
Lactose	-	+	-	(-)	-
D-Manitol	+	+	+	+	+
Adonitol	-	-	+	-	-
D-Sorbitol	-	+	-	-	-
Rafinose	-	(+)	-	(-)	+
L-Ramnose	-	(+)	+	+	+
D-Xilose	-	+	+	+	+
Celobiose	-	-	+	+	+
D-Arabitol	-	-	+	-	-
Utilização de acetato	+	+	+	(+)	(-)

Como mencionado anteriormente, as bactérias deste gênero estão agrupadas, junto com *Enterobacter* spp., no grupo dos coliformes termotolerantes, e são amplamente utilizadas como indicadores de contaminação fecal, especialmente em ambientes aquáticos (FIKSDAL et al., 1997; CONAMA, 2000; FOPPEN & SCHIJVEN, 2006; LOURENÇO et al., 2007; HACHICH et al., 2012; KELLER et al., 2019).

Dentre todas as espécies do gênero, *Escherichia coli* é, sem dúvida, a melhor estudada. São encontradas associadas ao trato gastrointestinal de animais homeotermos, sendo muito utilizadas como indicadoras de contaminação fecal (FOPPEN & SCHIJVEN, 2006; HACHICH et al., 2012; ANDRADE et al., 2015). Apesar de serem parte da microbiota, podem ser patógenos oportunistas para humanos e demais animais, causando diversas infecções, algumas muito graves. Dentre as cepas mais virtulentas, temo a *Escherichia coli* serotipo O157:H7, responsável pela diarreia hemorrágica, podendo ser letal (BRESSER et al., 1993; MEAD & GRIFFIN, 1998; PERNA et al., 2001; RANGEL et al., 2005; PENNINGTON, 2010). Além do serotipo O157:H7, diversas cepas de *E. coli* multirresistentes vêem sendo reportadas em ambientes aquáticos, incluindo ambientes costeiros (*e.g.* praias), representando um sério risco para a saúde pública e economia destes locais (MACLELLAN, 2004; ISHII et al., 2007; WALK et al., 2007; FIGUEIRA et al., 2011; ANDRADE et al., 2015).

Outra espécie importante do gênero é *E. fergusonii*, que é considerada um patógeno emergente, responsável por infecções oportunistas (FARMER et al., 1985; GAASTRA et al., 2014). Apresenta diversos artigos associando este microrganismo com uma ampla gama de infecções em humanos e animais, incluindo infecções do trato urinário, diarreia e até bacteremia, sendo considerada uma bactéria com potencial risco para a saúde humana e para a economia (BAIN & GREEN, 1999; FEGAN et al., 2006;

WRAGG et al., 2009; WEISS et al., 2011; MAIFRENI et al., 2013; GOKHALE et al., 2014; GAASTRA et al., 2014).

2.1.1.4. Klebsiella spp.

O gênero *Klebsiella* é um dos mais importantes dentre todas as bactérias da ordem *Enterobacteriales*, uma vez que apresenta diversas bactérias patogênicas multirresistentes, e está presente em uma ampla gama de ambientes (*e.g.* água, solo, animais e humanos) (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). O gênero foi descrito por Trevisan (1885) e seu nome dado em homenagem ao bacteriologista alemão Edwin Klebs (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Possui 11 espécies e cinco subespécies: *K. alba* (XU et al., 2015), *K. aerogenes* (TINDALL et al., 2017), *K. granulomatis* (ARAGÃO & VIANA, 1913; CARTER et al., 1999), *K. grimontii* (PASSET & BRISSE, 2018), *K. michiganensis* (SAHA et al., 2013), *K. oxytoca* (FLÜGGE, 1886; LAUTROP, 1956), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (ABEL, 1893; BERGEY et al., 1925; ØRSKOV, 1984), *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (SCHROETER, 1886; TREVISAN, 1887; ØRSKOV, 1984), *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (TREVISAN, 1887; ØRSKOV, 1984), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (BRISSE et al., 2014), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (BRISSE et al., 2014), *K. singaporensis* (LI et al., 2004). A Tabela 4 apresenta a diferenciação bioquímica entre as principais espécies do gênero.

Tabela 4 – Diferenciação bioquímica das diferentes espécies de *Klebsiella*. +: de 85% a 100% das cepas positivas; (+): de 50 a 80% das cepas positivas; (-): de 50 a 80% das cepas negativas; -: de 85% a 100% das cepas negativas (Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014)

Reação	*K. alba*	*K. michiganensis*	*K. oxytoca*	*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*	*K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*	*K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*	*K. singaporensis*
Indol	(+)	+	+	-	-	-	-
Gás de lactose à 44,5ºC	+	-	-	+	+	+	-
Crescimento à 10ºC	+	+	+	-	-	-	+
Vermelho de metil	-	-	-	-	+	+	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	-	-	+
Utilização de:							
Palatinose	ND	ND	+	+	-	-	-
L-Sorbose	+	ND	+	-	-	-	-
Urease	+	-	+	+	-	-	+

Dentre todas as espécies do gênero, a *K. pneumoniae* é a que mais recebe atenção, uma vez que, apesar de ser uma parte da microbiota natural da boca, pele e trato gastro intestinal de humanos, está associada com diversas infecções (BRUN-BUISSON et al., 1987; WANG et al., 1998; YIGIT et al., 2001; KO et al., 2002; GASIK et al., 2009; PATEL et al., 2015). Ademais, diversos registros nos últimos 15 anos, demonstram que mais cepas de *K. pneumoniae* apresentam genes que conferem resistência à carbapenemases (KPC), sendo um sério problema para a saúde pública (WEI et al., 2006; ANDERSON et al., 2007; NORDMANN et al., 2009; MUNOZ-PRICE et al., 2013). Outro ponto importante, é o acometimento de animais (*e.g* peixes e frutos do mar), afetando diretamente a economia (*e.g.* pesca), além de expor os consumidores ao risco de contaminação (TAYLOR et al., 1979; SINGH & KULSHRESHTHA, 1992; ZHANG et al., 2018; GHAFUR et al., 2019; MANSOOR et al., 2019). Quando isoladas do ambiente, são associadas à contaminação, principalmente por fezes de animais homeotermos, incluindo humanos, podendo ser um forte indicativo de contaminação por esgotos domésticos (FRAZZON, 2017; HLADICZ et al., 2017; HENRIOT et al., 2019).

2.1.1.5. Raoutella spp.

Descrito recentemente (DRANCOURT et al., 2001), o gênero *Raoutella* era classificado como três espécies do gênero *Klebsiella*, porém com os avanços moleculares, foi possível identificar que era um novo gênero (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Atualmente é composto por quatro espécies:*R. electrica* (KIMURA et al., 2014), *R. ornithinolytica* (SAKAZAKI et al., 1989; DRANCOURT et al., 2001), *R. planticola* (BAGLEY et al., 1982; DRANCOURT et al., 2001) e *R. terrigena* (IZARD et al., 1981; DRANCOURT et al., 2001). São microrganismos ubíquos, podendo estar presentes em amostras de solo, água, vegetais, e serem patógenos humanos (BAGLEY & BRENNER, 1981; CASTANHEIRA et al., 2009; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Caracterizam-se por não apresentarem motilidade, possibilidade de crescimento a 10ºC (DRANCOURT et al., 2001). Importantes testes bioquímicos de diferenciação como utilização de citrato e glicose como fonte de carbono, reação positiva para o teste de Voges-Proskauer, produção ácido e gás a partir de glicose e a maioria das cepas produzirem 2-3-butanodiol a partir da fermentação da glicose, estão apresentados na Tabela 5 (DRANCOURT et al., 2001; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014).

Tabela 5 – Diferenciação bioquímica das diferentes espécies de *Raoutella* spp. +: positivo, -: negativo. (Adaptado de: DRANCOURT et al., 2001; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014)

Reação	***R. plantiocola***	***R. terrigena***	***R. ornithinolytica***
Indol	-	+	-
Descarboxilase de ornitina	+	+	-
Utilização de:			
4-Aminobutirato	-	+	-
Benzoato	-	-	+
m-Cumarato	-	+	-
D-Glicosamina	-	-	+
Histamina	-	-	+
5-Cetogluconato	-	-	+
D-Melezitose	-	-	+
Fenilacetato	-	-	+
Putrescina	-	-	+
Quinato	+	+	+
L-Tartarato	+	+	+
D-Turanose	-	-	+

Anteriormente classificada como *Klebsiella plantiocola* ou *Klebsiella trevisanii*, *R. plantiocola* foi reclassificada após análises comparativas de 16S rRNA e genes *rpo*B, (DRANCOURT et al., 2001; CHUN et al., 2014). São bactérias aeróbicas, sem motilidade e comumente são encontradas principalmente em ambientes aquáticos (WALCKENAER et al., 2004), porém alguns casos de infecção em humanos têm sido registrados, especialmente em pacientes imunocomprometidos (ALVES et al., 2007; OLSON et al., 2013; PUERTA-FERNANDEZ et al., 2013; CHUNG et al., 2014; TSENG et al., 2014).

Anteriormente classificada como *Klebsiella terrigena,* a espécie *R. terrigena*, é comumente encontrada em ambientes aquáticos e em amostras de solo (IZARD et al., 1981; DRANCOURT et al., 2001; SEKOWSKA et al., 2018). Apesar de ser considerada uma bactéria ambiental, pode ocorrer como patógeno oportunista em humanos (SHAIKH & MORGAN, 2011; DEMIRAY et al., 2015; WANG et al., 2016; FAZAL et al., 2019; MAL et al., 2019). Ademais, também pode ocorrer como contaminante em alguns alimentos, incluindo alimentos de origem marinha, como peixes e frutos do mar (TANTASUTTIKUL & MAHAKARNCHANAKUL, 2019). Por si só, esta espécie não representa um grande risco à saúde pública, porém, com o surgimento de diversas cepas multirresistentes, há um elevado risco para que, além da contaminação, estes microrganismos funcionem como resistomas (DIXON et al., 2016; BRANDT et al., 2017).

R. ornithinolytica, anteriormente nomeada *Klebsiella ornithinolytica*, é uma das principais e mais estudadas espécies do gênero *Raoutella* (DRANCOURT et al., 2001; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Assim como as demais espécies do gênero, é uma bactéria encontrada, principalmente em ambientes aquáticos, mas pode também ser isolada de peixes e insetos (PULIAN MORAIS et al., 2009; MAU & ROSS, 2010), porém

pode tornar-se um patógeno oportunista em pessoas com algum imunocomprometimento (PULIAN MORAIS et al., 2009; SANDAL & OZEN, 2014; NAKASONE et al., 2015). Alguns casos de bacteremia foram reportados, contudo, o principal fato alarmante é a presença de cepas resistentes, incluindo para carbapenemases (SUN et al., 2015; TRIVEDI et al., 2016; GALLER et al., 2017; LUO et al., 2017; ABBAS & AHMAD, 2018).

2.1.2. Família *Erwiniaceae*

Segundo Adeolu et al. (2016), a família *Erwiniaceae* possui seis gêneros, sendo eles: *Erwinia* (HAUBEN et al., 1998), *Buchnera* (MUNSON et al., 1991), *Pantoea* (BRADY et al., 2010), *Phaseolibacter* (HALPERN et al., 2013), *Taumella* (HOLLIS et al., 1981) e *Wigglesworthia* (AKSOY, 1995), além de serem catalase-positiva, oxidase-negativa, não produzirem indol ou hidrogênio dissulfido, Voges-Proskauer positivo (exceto *Erwinia toletana*, *Erwinia typographi* e algumas cepas de *Erwinia oleae*). Ainda segundo o autor (ADEOLU et al., 2016), estes gêneros foram agrupados em um cluster monofilético, devido à 12 assinaturas conservadas em algumas proteínas, tais como a glutamato-cisteína ligase e RNA helicase.

2.1.2.1. *Pantoea* spp.

O gênero *Pantoea* foi descrito por Gavini et al. (1989), sendo um grupo relativamente dispersos por diversos habitats, desde patógenos de plantas até patógenos de humanos (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Apresenta 25 espécies e duas subespécies: *P. agglomerans* (EWING & FIFE, 1972; GAVINI et al., 1989), *P. allii* (BRADY et al., 2011), *P. ananatis* (SERRANO, 1928; MERGAET et al., 1993), *P. anthophila* (BRADY et al., 2009), *P. brenneri* (BRADY et al., 2010), *P. coffeiphila*

(GUEULE et al., 2015), *P. conspicua* (BRADY et al., 2010), *P. cypripedii* (BRADY et al., 2010), *P. deleyi* (BRADY et al., 2009), *P. dispersa* (GAVINI et al., 1989), *P. eucalypti* (BRADY et al., 2009), *P. eucrina* (BRADY et al., 2010), *P. rodasii* (BRADY et al., 2012), *P. rwandensis* (BRADY et al., 2012), *P. septica* (BRADY et al., 2010), *P. stewartii* subsp. *indologenes* (MERGAERT et al., 1993), *P. stewartii* subsp. *stewartii* (SMITH, 1898; MERGAERT et al., 1993), *P. vagans* (BRADY et al., 2009) e *P. wallisii* (BRADY et al., 2012).

Apesar de comumente associado à doenças de plantas (CRUZ et al., 2007; COUTINHO & VENTER, 2009; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014), as bactérias deste gênero podem também ser isoladas de ambientes aquáticos e solos (WALTERSON & STAVRINIDES, 2015). Segundo WALTERSON & STAVRINIDES, o gênero *Pantoea* apresenta uma ampla gama de funções, incluindo potencial terapêutico e biorremediador, além de estar presente em uma ampla variedade de habitats (Figura 2).

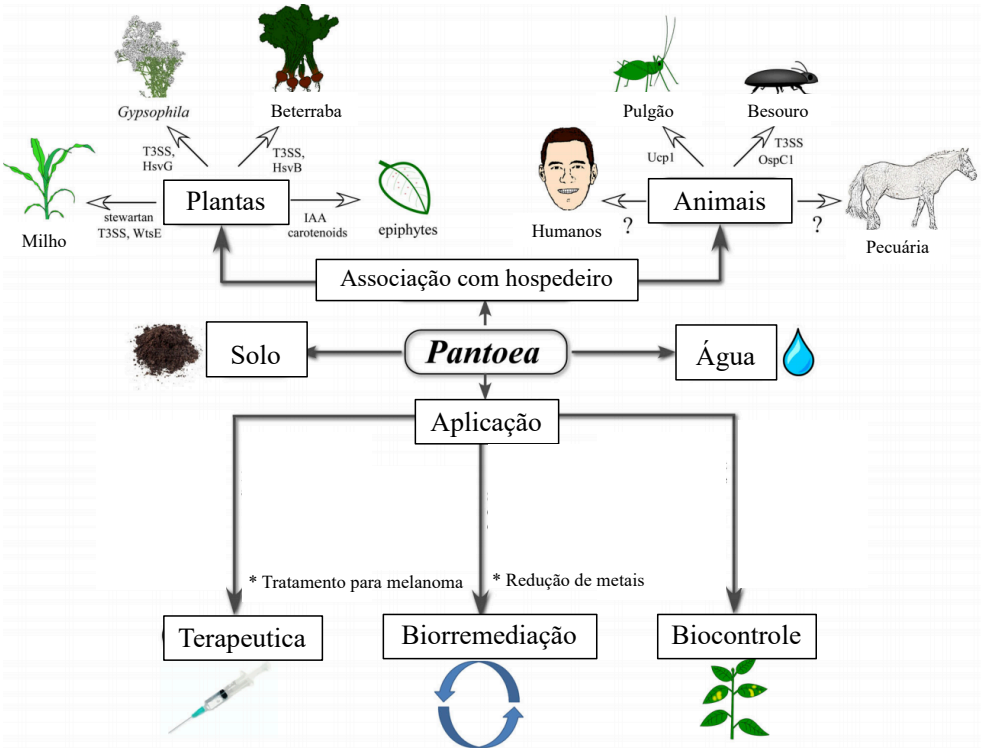

Figure 2 – Esquema apresentando as diversas associações e aplicações do gênero *Pantoea* (Traduzido de WALTERSON & STAVRINIDES, 2015)

Tabela 6 -Testes bioquímicos para a diferenciação fenotípica de bactérias do gênero *Pantoea*. +: 90 a 100% de positividade entre 24-48h; (+) 90 a 100% de positividade entre 1 e 4 dias; -: negativa; d: de 11 a 89% das cepas positivas entre 1 e 4 dias; (d): 11-89% de positividade entre 3 e 4 dias; ND: não determinado. Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014.

Reação	***P. agglomerans***	***P. allii***	***P. ananatis***	***P. anthophila***	***P. brenneri***	***P. conspicua***	***P. cypripedii***	***P. deleyi***	***P. dipersa***	***P. eucalypti***	***P. eucrina***	***P. rodasii***	***P. rwandensis***	***P. septica***	***P. stewartii* subsp. *indologenes***	***P. stewartii* subsp. *stewartii***	***P. vagans***	***P. wallisii***
Ácido de:																		
Glicerol	(d)	+	+	ND	d	-	+	+	(d)	d	-	+	+	d	d	-	d	+
Dulcitol	-	-	-	ND	d	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Lactose	d	+	+	-	d	+	-	-	+	(+)	d	-	-	d	+	-	(+)	-
Sacarose	+	+	+	+	ND	-	+	+	+	+	+	+	-	d	ND	ND	+	-
Rafinose	(d)	+	+	ND	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Utilização de:																		
Adonitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
i-Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	d	+	+	-	-	-	-	-
Lactose	-	+	+	-	(d)	+	+	-	-	+	-	d	-	d	+	d	-	-
Lactulose	-	+	+	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	d	+	d	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	d	ND	ND	-	+
Melibiose	-	+	+	ND	-	-	+	-	-	-	-	d	+	d	+	+	-	-
D-Psicose	+	ND	+	ND	ND	ND	+	+	(d)	(d)	ND	+	+	ND	ND	ND	-	-
Ácido quinínico	-	+	(+)	ND	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	ND	ND	-	d
D-Serina	-	-	-	ND	ND	ND	(+)	-	-	-	ND	d	d	ND	ND	ND	-	-
Sacarose	(+)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	d	ND	ND	+	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d	ND	ND	-	-

Mesmo sendo bactérias predominantemente ambientais e/ou patógenas de plantas, há alguns relatos de infecções em humanos causadas por *Pantoea* spp. (KRATZ et al., 2003; DE BAERE et al., 2004; LIM et al., 2006; ANDREEA et al., 2007; KAHVECI et al., 2011; LOTTE et al., 2019; MERIDIAN et al., 2019), incluindo o isolamento de cepas resistentes à antibióticos (GAJDÁCS, 2019; HOOD & VAUGHN, 2019).

2.1.3. Família *Pectobacteriaceae*

Família composta por bactérias descobertas há menos de 20 anos, pertencentes a cinco gêneros: *Pectobacterium* (HAUBEN et al., 1998), *Brenneria* (BRADY et al., 2014), *Dickeya* (SAMSON et al., 2005), *Lonsdalea* (BRADY et al., 2012) e *Sodalis* (DALE & MAUDLIN, 1999). Produzem ácido a partir de *N*-acetilglucosamina, negativos para oxidase, arginina dehidrolase, ornitina descarboxilase, lisina descarboxilase e hidrogênio disulfido, além de serem catalase-positivos (ADEOLU et al., 2016). Baseado em análises moleculares (genoma e multi-genes), Adeolu et al. (2016) agrupou os gêneros da família *Pectobacteriaceae* em um cluster monofilético, devido a quatro assinaturas conservadas em proteínas importantes como o ativador transcriptonal RhaS, a proteína MotB do motor flagelar, histidina quinase e uma proteína hipotética. São bactérias que predominantemente colonizam espécies vegetais, como a batata, podendo causar algumas doenças (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014).

2.1.4. Família *Yersiniaceae*

Esta família apresenta gêneros importantes, incluindo o gênero *Yersinia*, famoso por ser o patógeno da Peste bulbônica. Ademais *Chania* (EE et al., 2016), *Ewingella* (GRIMONT et al., 1983), *Rahnella* (IZARD et al., 1978), *Rouxiella* (LE FLECHE-

MATEOS et al., 2015), *Samsonia* (SUTRA et al., 2001) e *Serratia* (BIZIO, 1823). As bactérias desta família são catalase-positivas, sem a produção de hidrogênio disulfido e apresentam motilidade (ADEOLU et al., 2016). Apresentam três assinaturas conservadas, sendo assim, Adeolu et al (2016) agrupou os gêneros citados acima em um cluster monofilético.

2.1.4.1. *Serratia* spp.

Este gênero apresenta pigmentação vermelha característica, podendo crescer em meios mínimos e sem adição de fatores de crescimento (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Pertencem a este gênero as seguintes espécies: *S. aquatillis* (KÄMPFER & GLAESER, 2016), *S.entomophila* (GRIMONT et al., 1988), *S. ficaria* (GRIMONT et al., 1981), *S. fonticola* (GAVANI et al., 1979; GEIGER et al., 2010; KÄMPFER & GLAESER, 2015), *S. glossinae* (GEIGER et al., 2010), *S. grimesii* (GRIMONT et al., 1983), *S. liquefaciens* (GRIMES & HENNERTY, 1931), *S. marcescens* subsp *marcescens* (BIZIO 1823), *S. marcescens* subsp *sakuensis* (AJITHKUMAR et al., 2003), *S. myotis* (GARCÍA-FRAILE et al., 2015), *S. nematodiphila* (ZHANG et al., 2009), *S. odorifera* (GRIMONT et al., 1978), *S. oryzae* (ZHANG et al., 2017), *S. plymuthica* (LEHMANN & NEUMANN, 1896), *S. proteamaculans* subsp *proteamaculans* (PAINE & STANSFIELD, 1919), *S. quinovorans* (GRIMONT et al., 1978), *S. symbiotica* (SABRI et al., 2011), *S. ureilytica* (BHADRA et al., 2005) e *S. vespertilionis* (GARCÍA-FRAILE et al., 2015).

Bioquimicamente, caracterizam-se por produzirem ácido a partir de maltose, salicina e trealose, além de hidrolisarem ONPG, e diferenciam-se entre si conforme apresentado na Tabela 7. As espécies deste gênero podem ser frequentemente isoladas de

ambientes aquáticos, entretanto podem ser encontradas em amostras de solo, plantas e animais (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014).

Entre todas as espécies do gênero, *Serratia marcescens* é sem dúvidas a melhor estudada, especialmente por ser um patógeno oportunista do homem e patógeno de alguns insetos (COSTA et al., 2019). Diversos casos foram reportados, desde o trato nasal colonizado por *S. marcescens* até bacteremias (VILLARINO et al., 1989; YU et al., 1998; OSTROWSKY et al., 2002; BERNARD et al., 2018). Além dos isolados clínicos, o surgimento de cepas multirresistentes e potencialmente patogênicas, têm tornado-se uma séria preocupação mundial (HOPKINS et al., 2017; HEMARAJATA et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2018; SIMSEK, 2019). Apesar de grande parte dos estudos sobre esta espécie focarem em achados clínicos, *S. marcescens* é estudado há pelo menos 40 anos devido à sua produção de quitinases (CHAKRABORTTY et al., 2012). Estas quitinases apresentam um papel importante na degradação da quitina, podendo ter sua utilização na degradação de biofilmes e biocontrole de outros organismos, como *Sclerotium rolfsii* (ORDENLICH et al., 1988; TUVENG et al., 2017; COSTA et al., 2019).

Outra espécie com relativa importância é *Serratia liquefaciens,* que é comumente encontrada em amostras de solo e água (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Apesar de incomum, *S. marcescens* pode ser um patógeno oportunista, sendo associado com sepses após processos de transfusão de sangue e choque endotóxico (ROTH et al., 2000; GROHSKOPF et al., 2001; HARNETT et al., 2001; DUBOUIX et al., 2005)

Tabela 7 – Lista de testes bioquímicos para a diferenciação de bactérias do gênero *Serratia*. +: positivo; -: negativo; F: fraco; ND: não determinado. Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014.

Reação	***S. entomophila***	***S. ficaria***	***S. fonticola***	***S. glossinae***	***S. grimesii***	***S. liquefaciens***	***S. marcescens* subsp. *marcescens***	***S. marcescens* susp. *sakuensis***	***S. nematodiphila***	***S. odorifera***	***S. plymuthica***	***S. proteamaculans***	***S. quinvorans***	***S. rubidaea***	***S. symbotica***	***S. ureilytica***
Urease	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
Catalase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	ND	-
Acetoína	+	+	-	+	-	+	+	ND	-	+	-	+	+	-	ND	+
Utilização de:																
L-Lisina	-	-	+	+	+	+	+	ND	+	+	-	+	+	-	-	+
L-ornitina	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Citrato	+	+	+	+	-	+	+	ND	+	+	+	+	-	+	-	+
Gelatina	+	+	-	-	-	-	+	ND	ND	+	-	-	+	+	-	+
Piruvato	+	+	-	+	-	+	+	ND	-	+	-	+	+	-	ND	+
Inositol	+	-	+	+	+	+	+	ND	+	+	-	+	+	+	ND	+
D-Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	ND	+
L-Ramnose	-	+	+	-	-	-	-	-	ND	+	-	-	+	-	ND	-
Sacarose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
Melibiose	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	ND	-
Amigdalina	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	-	+	ND	+
L-Arabinose	-	+	+	+	+	+	+	-	ND	+	+	+	+	+	ND	-
Arbutina	+	+	+	+	+	+	-	ND	ND	+	+	+	-	+	ND	+
Celobiose	F	F	-	-	+	-	-	ND	+	+	+	-	+	+	ND	+
Dextrina	-	-	-	F	-	-	-	ND	+	F	-	F	+	-	ND	+
Aesculina	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+	-	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	-	ND	+	+	+	+	+	+	ND	+
Glicerol	+	-	+	+	+	+	+	ND	ND	-	-	+	+	+	-	+
Insulina	-	+	-	-	-	-	-	ND	+	-	-	-	F	-	ND	+
Maltose	+	+						ND	+	+	+	-	-	+	-	+
Melezitose	-	F	-	-	-	+	-	ND	+	-	+	-	-	-	ND	-
Rafinose	-	-	+	+	+	F	-	-	+	-	+	-	+	+	ND	-
Amido	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	-
D-Xilose	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	ND	-

2.1.4.2. Rahnella spp.

Descrito inicialmente por Izard et al. (1979), o gênero apresenta seis espécies: *R. aquatilis* (IZARD et al., 1981), *R. bruchi* (BRADY et al., 2017), *R. inusitata* (BRADY et al., 2017), *R. variigena* (BRADY et al., 2017), *R. victoriana* (BRADY et al., 2017) e *R. woolbedingensis* (BRADY et al., 2017). Caracterizam-se por apresentarem motilidade a

25ºC, entretanto é séssil a 36ºC (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014; BRADY et al., 2017). Outras características bioquímicas importantes são a produção de ácido a partir de L-arabinose, D-glicose, lactose, D-manitol, salicina, celobiose, maltose, D-manose, melibiose, L-ramnose, D-xilose e sacarose (BRENNER et al., 1998; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014)

Apresenta ampla distribuição na natureza, incluindo amostras de solo e água (JANDA, 2006), entretanto podem, em raros casos, ser patógenos de humanos, especialmente pacientes imunosuprimidos (CHANG et al., 1999; TASH, 2005; GAITAN & BRONZE, 2010; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Também é importante na fixação do nitrogênio em algumas plantas (BERGE et al., 1991; KIM et al., 1997), e há relatos da utilização de *R. aquatilis* no biocontrole de patologias vegetais causadas pelo gênero *Xantomonas* (EL-HENDAWY et al., 2005).

2.1.5. Família *Hafniaceae*

Adeolu et al. (2016) agrupou os gêneros *Hafnia* (MØLLER, 1954), *Edwardsiella* (EWING et al., 1965) e *Obesumbacterium* (SHIMWELL, 1963) em um cluster monofilético baseado em quatro assinaturas conservadas em proteínas, como glucose-1-fosfatase adenililtransferase. Bactérias deste gênero apresentam catalase-positiva, oxidase-negativa, são negativas para lisina descarboxilase, além de serem capazes de reduzir nitratos (ADEOLU et al., 2016).

2.1.6. Família *Morganellaceae*

Devido a sete assinaturas conservadas na estrutura molecular de algumas proteínas (*e.g.* fosfato acetiltransferase), Adeolu et al. (2016) agrupou *Morganella* (FULTON,

1943), *Arsenophonus* (GHERNA et al., 1991), *Cosenzaea* (GIMMANCO et al., 2011), *Moellerella* (HICKMAN-BRENNER et al., 1984), *Photohabdus* (BOEMARE et al., 1993), *Proteus* (HAUSER, 1885), *Providencia* (EWING, 1962) e *Xenarhabdus* (THOMAS & POINAR JR, 1979). São bactérias oxidase-negativas e negativas para Voges-Proskauer (ADEOLU et al., 2016).

2.1.6.1. *Proteus* spp.

Inicialmente descrito por Gustav Hauser (1885), este gênero conta, atualmente, com 7 espécies: *P. alimentorum* (DAI et al., 2018a)*, P. cibarius* (HYUN et al., 2016), *P. columbae* (DAI et al., 2018b)*, P. hauseri* (O'HARA et al., 2000), *P. mirabilis* (HAUSER, 1885), *P. penneri* (HICKMAN et al., 1983), *P. terrae* (BEHRENT et al., 2016) e *P. vulgaris* (HAUSER, 1885). São bactérias que apresentam crescimento ótimo a 37ºC, são positivas para a produção de H_2S, produzem ácidos a partir de glicose e D-xilose, são positivos para fenilalanina desaminase, utilização de tirosina (O'HARA et al., 2000). As diferenças bioquímicas entre as espécies de *Proteus* spp., encontram-se na Tabela 8.

O gênero está amplamente distribuindo em uma grande diversidade de habitats, incluindo o trato gastrointestinal de mamíferos, aves e répteis (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Diversos casos de infecções em humanos foram registrados, especialmente envolvendo *P. mirabilis* (STICKLER et al., 1993; EBRIGER & RASHID, 2006; HOLA et al., 2012; HAMILTON et al., 2018).

Tabela 8 – Diferenciação bioquímica das diferentes espécies do gênero *Proteus* (Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014).

	Porcentagem de positivos (48h)			
Reação	***P. mirabilis***	***P. penneri***	***P. vulgaris***	***P. hauseri***
Produção de indol	2	0	100	100
Citrato (Simmons)	65	4	29	0
Sulfato de hidrogênio (em Ágar TSI)	98	32	57	50
Motilidade		89	57	100
Hidrólise de gelatina (22ºC)	90	56	57	100
Produção de gás	96	46	86	0
Produção de ácido a partir de:				
Glicerol	70	40	29	0
Lactose	2	9	0	0
Maltose	0	96	100	100
a-metil-D-glucosídeo	0	81	86	50
Rafinose	1	9	0	0
L-Ramnose	1	0	0	0
Salicina	0	0	100	0
Sacarose	15	96	100	100
Trealose	98	62	0	0
Tartaro (Jordan)	87	89	14	0
Hidrólise de aesculina	0	0	100	0
Utilização de acetato	20	12	14	0
Lipase (óleo de milho)	92	35	14	0
Redução de nitrato	95	12	100	0
ONPG	0	80	57	100
DNase (25ºC)	50	10	0	0

2.1.6.2. *Providencia* spp.

As bactérias deste gênero apresentam como principais características bioquímicas a ausência de produção de H2S, produção de gás a partir da fermentação de açúcares (exceto lactose), Voges-Proskauser negativo e teste de uréia negativo (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014).

O gênero conta com nove espécies, sendo elas: *P. alcalifaciens* (DE SALES GOMES, 1944), *P. burhodogranariea* (JUNEJA & LAZZARO, 2009), *P. heimbachae* (MÜELLER et al., 1986), *P. rettgeri* (HADLEY, 1918; BRENNER et al., 1978), *P. rustigianii* (HICKMAN-BRENNER et al., 1983), *P. sneebia* (JUNEJA & LAZZARO, 2009), *P. stuartii* (BUTTIAUX et al., 1954), *P. thailandensis* (KHUNTHONGPAN et al., 2014) e *P. vermicola* (SOMVANSHI et al., 2006). A diferenciação bioquímica entre as espécies, está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Teste bioquímicos para diferenciar as nove espécies de *Providencia* spp. +: positivo; -: negativo; SD: sem dados. Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014 e KHUNTHOPAN et al., 2014.

Reação	***P. alcalifaciens***	***P. burhodogranariea***	***P. heimbache***	***P. rettgeri***	***P. rustigianii***	***P. sneebia***	***P. stuartii***	***P. thailandensis***	***P. vermicola***
Utilização de:									
D-Adonitol	+	+	+	+	-	-	-	SD	+
D-Arabitol	-	+	+	+	-	+	-	SD	+
L-Arabitol	-	-	+	+	-	-	-	SD	+
Esculina	-	-	+	+	-	+	-	+	-
D-Galactose	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Inositol	-	+	+	+	-	-	+	SD	+
2-Cetogluconato	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	SD	-
D-Manitol	-	+	+	+	-	+	-	+	+
Trealose	-	+	-	-	-	+	-	SD	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	+	SD	-

Bactérias do gênero *Providencia* são componentes da microbiota intestinal de humanos, mas também podem ser encontrados em insetos (JACKSON et al., 1995; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Outro local onde podem ser encontradas é em amostras de efluentes, indicando uma possível contaminação fecal (STOCK & WIEDEMANN, 1998; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Apesar de não serem usualmente patogênicas, podem causar infecções em humanos (O'HARA et al., 2000; MURATA et al., 2001; TRIBE & ROOD, 2002; CHANDER et al., 2006; SHIMA et al., 2012). E alguns pesquisadores reportaram cepas multirresistentes, incluindo a presença de genes de resistência a carbapenêmicos (CHANDER et al., 2006; LEE et al., 2007; MAHROUKI et al., 2015).

2.1.7. Família *Budviciaceae*

Família composta pelos gêneros *Budvicia* (LANG et al., 2012), *Leminorella* (HICKMAN-BRENNER et al., 1985) e *Pragia* (ALDOVÁ et al., 1988). Apresentam como principais características catalase-positiva, oxidase-negativa e negativo para indol, arginina dihidrolase, ornitina e descarboxilase de lisina, além de produzirem hi e reduzirem nitrato (ADEOLU et al., 2016). Ademais, por meio das análises de características moleculares, Adeolu et al. (2016) observou que haviam nove assinaturas conservadas nas proteínas bifuncionais, fazendo com que estes três gêneros fossem agrupados em um cluster monofilético.

2.1.7.1. *Budvicia* spp.

O gênero *Budvicia* foi inicialmente descrito por Bouvet et al. (1985), são bacilos gram-negativos, com 2,5 a 3,0 μm de comprimento, crescendo em pequenas colônias em Ágar Nutriente, entre 4ºC e 36ºC (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014). Até o momento, existem apenas duas espécies: *Budvicia aquatica* (BOUVET et al., 1985) e *Budvicia diplopodorum* (LANG et al., 2012). Apesar de ter sido inicialmente descrita por Aldová et al. (1983), o nome não havia sido validado, sendo assim, a publicação de Bouvet et al. (1985) foi a publicação válida para a descrição do novo gênero e nova espécie: *B. aquatica*. Foram isoladas três cepas de amostras de água da região da República Tcheca e Eslováquia, antiga Tchecoslováquia (BOUVET et al., 1985). Apesar de ser uma espécie encontrada naturalmente no meio ambiente, especialmente em ambientes aquáticos, há relatos de cepas que infectaram humanos, sendo isoladas de amostras de sangue e urina de pacientes imunocomprometidos (TOMCZAK & SMUSZKIEWICZ, 2014; SINGH & EBIBENI, 2016), incluindo o caso de contaminação após a passagem do furacão Katrina, nos EUA (CORBIN et al., 2007).

Lang et al. (2012) isolaram *B. diplopodorum* do intestino de *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda), e por análises de 16S rRNA (Figura 3), observou-se a similaridade (98,4%) com *B. aquatica*. A Tabela 10 apresenta os testes bioquímicos para identificar e diferenciar estas duas espécies. A principal diferença entre as duas espécies é a incapacidade de *B. diplopodprum* em produzir ácido a partir de D-arabinose, D-arabitol, 2-cetogluconato, 4-cetogluconato, D-xilose e D-lactose, enquanto que *B. aquatica* (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014).

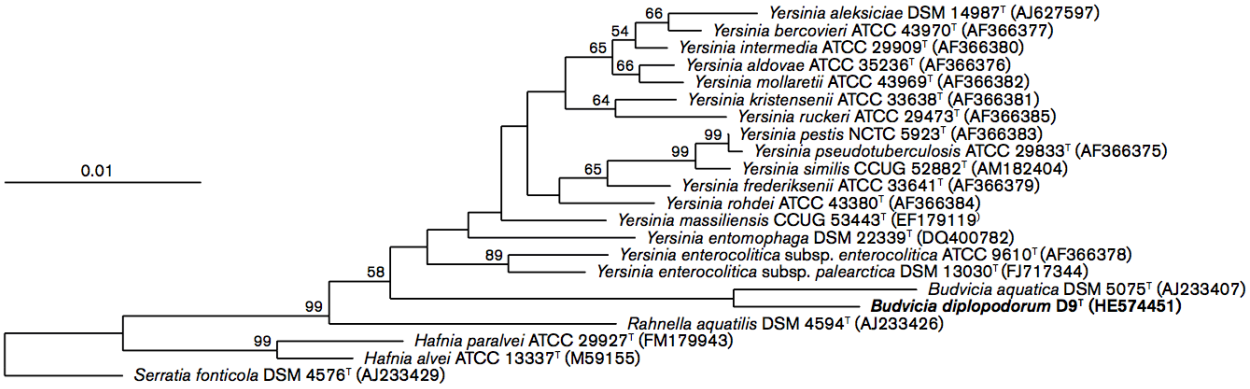

Figura 3 – Classificação taxonômica de *B. diplopodorum*. (Lang et al., 2012)

Tabela 10 – Diferenças bioquímicas entre *Budvicia aquática* e *Budvicia dipoplodorum*. +: positivo; -: negativo. Adaptado de TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014.

Reação	*B. dipoplodorum*	*B. aquatica*
β-Galactosidase	-	+
Descarboxilase de lisina	-	-
Descarboxilase de ornitina	-	-
Utilização de citrato	-	-
Produção de H_2S	-	+
Urease	-	+
Produção de indol	-	-
Produção de acetoína	-	-
Produção de ácido a partir de:	-	-
Inositol	-	-
D-Sorbitol	-	-
L-Ramnose	+	+
Sacarose	-	-
Melibiose	-	-
Amigdalina	-	-

2.1.7.2. *Leminorella* spp.

Descrita por Hickman-Brenner et al. (1985) em homenagem a Leon Le Minor, são bactérias semelhates a *Proteus* quando se trata de produção de H_2S, atividade de tirosinase e não fermentarem D-manose, diferenciando do gênero *Proteus* quanto a ausência de urease e desaminação da fenilalanina (IMHOFF, 2005; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014; SHARMA et al., 2017). São microrganismos sésseis a 36ºC, aeróbicas facultativas (IMHOFF, 2005) e, apresenta duas espécies: *L. grimontii* e *L. richardii*, ambas descritas por Hickman-Brenner et al. (1985). Estão presentes no trato gastrointestinal (IMHOFF, 2005), e podem causar infecções do trato respiratório e urinário (SHARMA et al., 2017; TEIXEIRA & MERQUIOR, 2014; DALAMAGA et al., 2006; BLEKHER et al., 2000).

2.2. Resistência Bacteriana

Mundialmente, a resistência aos antibióticos tornou-se uma grande preocupação, sendo considerado pela Organização Mundial da Saúde como uma das maiores ameaças à saúde pública global, segurança alimentar e ao desenvolvimento (NORDMANN et al., 2012; WHO, 2014). Em toda a história da medicina, é tido como o medicamento que teve maior sucesso, apesar de seu uso comercial ter iniciado por volta de 1940 com a penicilina (DAVIES, 2006; AMINOV, 2010; CDC, 2018). Descoberta por Alexander Fleming em 1928, a penicilina teve sua utilização impulsionada durante a Segunda Guerra Mundial (AMINOV, 2010; BUSH & MACIELAG, 2010; LANDECKER, 2016). Estima-se que antes da utilização da penilina, cerca de 80% dos pacientes infectados com *Staphylococcus aureus* morriam (BUD, 2007; LANDECKER, 2016).

Entretanto, alguns anos após a comercialização da penicilina, cepas resistentes começaram a ser identificadas e estudadas (CDC, 2018). Nos últimos 20 anos, a resistência bacteriana tem mostrado-se um risco emergente, uma vez que sua distribuição está cada vez mais global e a velocidade de transmissão (horizontal) de genes tem sido cada vez mais rápida (NORDMANN et al., 2012; FAIR & TOR, 2014). A Figura 4 apresenta uma linha do tempo, correlacionando o ano de descoberta/comercialização de alguns dos principais antibióticos, e a descoberta de cepas patogênicas resistentes.

Observando a Figura 4, é possível identificar que a velocidade de surgimento de novas cepas resistentes não é acompanhada pela descoberta de novos antibióticos, especialmente novas classes de antimicrobianos.

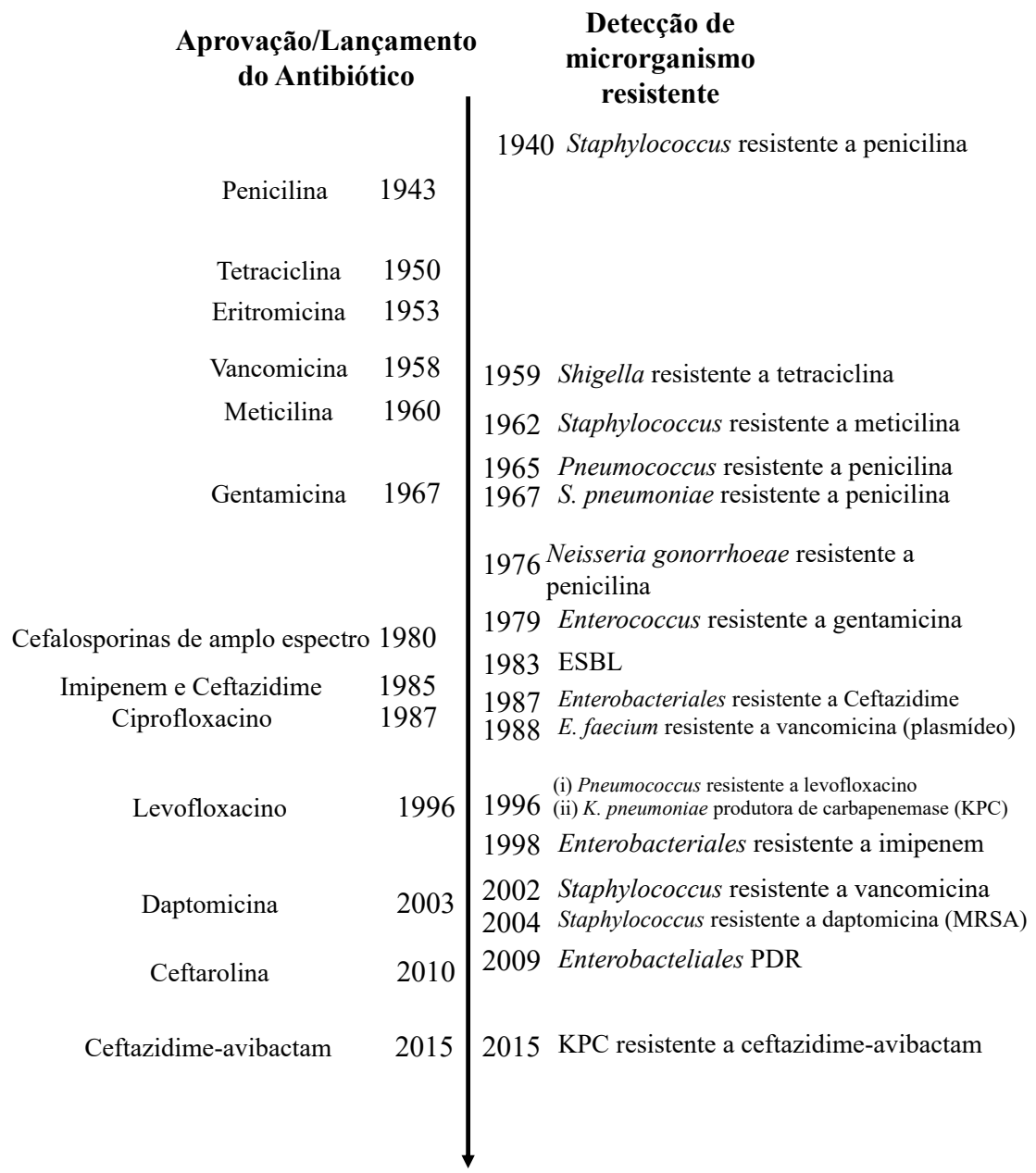

Figura 4 – Linha do tempo correlacionando o ano de Aprovação/Lançamento de um antibiótico *versus* o ano de descoberta da primeira cepa resistente a determinado antibiótico. Adaptado de CDC (2018 e 2019).

Estima-se que o investimento das indústrias farmacêuticas para a descoberta de novos antibióticos seja de aproximadamente US$ 1,7 bilhões (FAIR & TOR). Atualmente, existem 16 classes de antibióticos, porém há mais de 10 anos nenhuma nova classe é descoberta (ANVISA, 2007; COATES et al., 2011; BUCKLAND, 2017). São elas: 1) β-

lactâmicos, que incluem as penicilinas; 2) Quinolonas; 3) Glicopeptídeos; 4) Oxazolidinonas; 5) Aminoglicosídeos; 6) Macrolídeos; 7) Lincosaminas; 8) Nitroimidazólicos; 9) Cloranfenicol; 10) Estreptomicinas; 11) Sulfonamidas; 12) Tetraciclinas; 13) Glicilciclinas; 14) Polimixinas; 15) Daptomicinas; e 16) Gemifloxacinas.

Dentre todas as classes conhecidas até o momento, os β-lactâmicos são os antibióticos mais utilizado, seja na medicina humana e/ou veterinária (BUSH et al., 2010; NORDMANN et al., 2012; PAGE, 2012; BUSH, 2013). Este grupo de antibióticos, apresenta uma grande variedade estrutural, porém apresentam em comum seu núcleo constituído por um anel β-lactâmico (BUSH & MACIELAG, 2010; NORDMANN et al., 2012) (Figura 5). A classe é subdividida em quatro grupos principais: 1) Penicilinas; 2) Cefalosporinas; 3) Carbapenêmicos; e 4) Monobactâmicos.

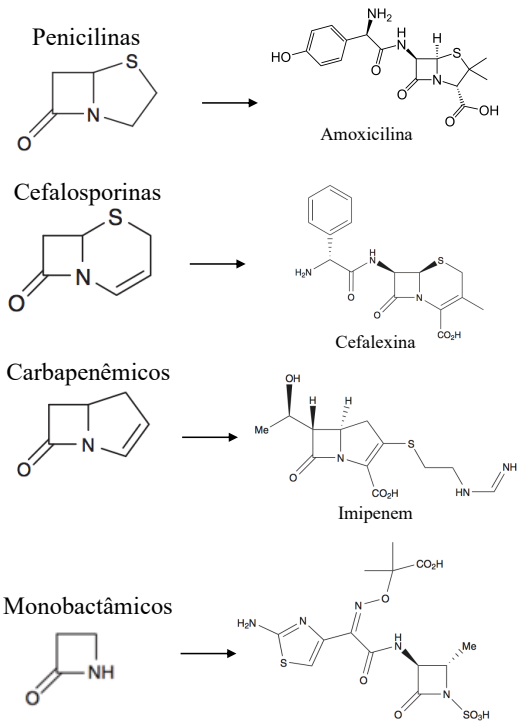

Figure 5 – Estruturas químicas dos quatro grupos pertencentes a classe dos β-lactâmicos, e ao lado exemplos de antibióticos de cada grupo. Penicilinas: amoxicilina; Cefalosporinas: Cefalexina; Carbapenêmicos: Imipenem; Monobactâmicos: Aztreonam. Adaptado de BUSH & MACIELAG (2010).

Dentre todos os grupos apresentados, os carbapenêmicos apresentam potente ação contra diversas bactérias Gram-negativas, especialmente *Enterobacteriales*, e devido ao seu mecanismo de ação e recente descoberta, são tidos como últimos recursos para tratar bactérias multirresistentes (BUSH & MACIELAG, 2010; NORDMANN et al., 2011; NORDMANN et al., 2012).

Os β-lactâmicos possuem, basicamente, o mesmo mecanismo de ação, ligando-se às proteínas ligadoras de penicilinas (PBP – *Penicillin-Binding Proteins*) (Figura 6). As PBPs possuem a função de manter a integridade da parede celular bacteriana (BUSH & MACIELAG, 2010). Sendo assim, os β-lactâmicos atuam inibindo a síntese, por meio da penetração através das porinas bacterianas e ligando-se às PBPs (BUSH & MACIELAG, 2010; NORDMAN et al., 2012).

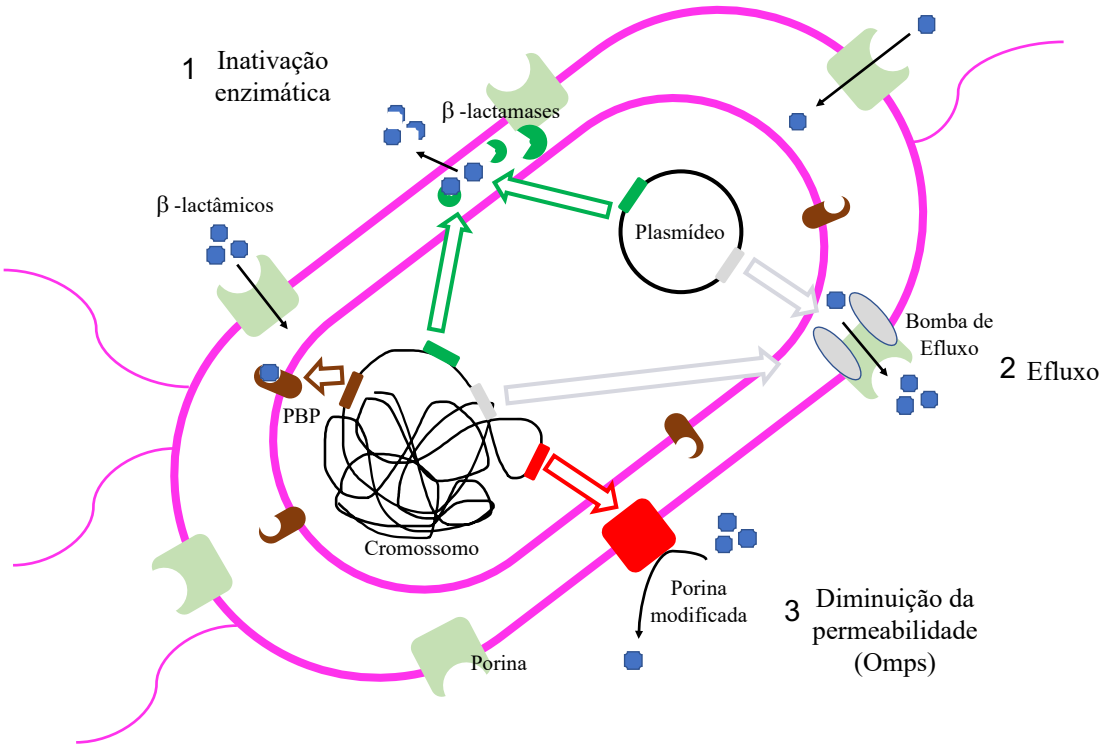

Figura 6 – Mecanismos primários de resistência à β-lactâmicos em Enterobacteriales. Estes mecanismos incluem: (i) inativação enzimática, codificada por genes presentes no plasmídeo e/ou cromossomo; (ii) diminuição da Adaptado de Nordmann et al. (2012).

Entretanto, antibióticos costumam ficar obsoletos devido ao surgimento de mecanismos de resistência bacteriana (WRIGHT, 2005; WRIGHT, 2010). Basicamente, existem três mecanismos de resistência bacteriana: 1) Inativação enzimática; 2) Bombas de efluxo; e 3) Diminuição da permeabilidade (Figura 6) (WRIGHT, 2005; WRIGHT, 2010; NORDMANN et al., 2012).

A desativação enzimática pode ocorrer de duas maneiras principais: (i) por meio da transferência de um grupo químico; ou (ii) por meio da hidrólise. A hidrólise é a forma mais comum de atuação das enzimas bacterianas, uma vez que a maioria dos antibióticos apresentam pontes químicas hidroliticamente susceptíveis (*e.g.* esteres e amidas) (WRIGHT, 2005). Dentre as principais enzimas, encontram-se as β-lactamases, apresentando uma grande diversidade de estruturas moleculares (WRIGHT 2005; BUSH, 2018).

As β-lactamases são enzimas muito versáteis, e foi o primeiro mecanismo de resistência bacteriana descrito (WRIGHT 2005; BUSH, 2018). Segundo Bush et al. (1995), as β-lactamases podem ser divididas em quatro grupos. Tais grupos de β-lactamases apresentam dois principais mecanismos de ação: serina dependentes (Ser-β-lactamases), como o caso dos Grupos 1, 2 e 4; e dependentes do íon metálico de Zn^{2+} (metalo-β-lactamases), como é o caso do Grupo 2 (Figura 7) (WRIGHT, 2005).

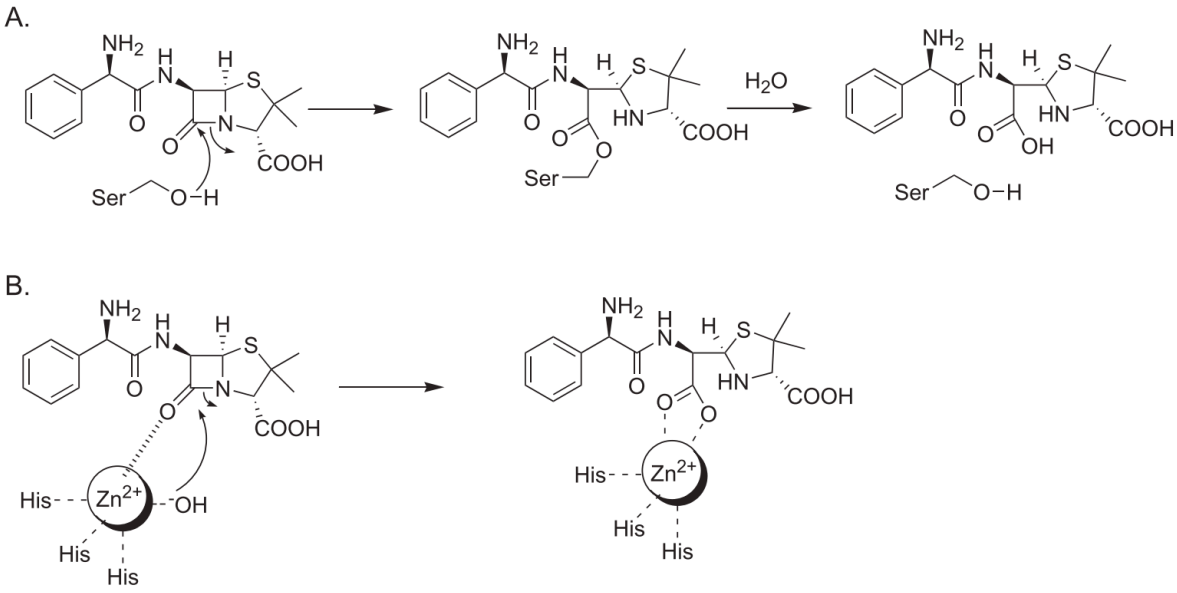

Figura 7 – Mecanismos gerais de A) Ser-β-lactamases, e B) metalo-β-lactamases (WRIGHT, 2005).

Outro importante mecanismo de resistência bacteriana são as alterações nas proteínas externas de membrana (Omps – *Outer membrane proteins*) (NORDMANN et al., 2012). No caso dos carbapenêmicos, a resistência pode ser ocasionada por mutações e/ou deleções nos sítios de ligação (*e.g.* mutações nas Omps), não permitindo a penetração do antibiótico na célula bacteriana (Figura 6) (BUSH, 2013; WALSH et al., 2005; NORDMANN et al., 2012).

Nos últimos anos, a rápida disseminação de bactérias Gram-negativas resistentes à β-lactamicos têm sido uma grande preocupação, especialmente com relação aos carbapenêmicos (DIENE & ROLAIN, 2014). Atualmente, bactérias resistentes aos carbapenêmicos, especialmente as Enterobacteriaceae (CRE – *Carbapenem resistant Enterobacteriaceae*) apresentam um crescente risco para a saúde pública global e econômia (WALSH et al., 2005; JANECKO et al., 2016; BUSH, 2018). Atualmente

O uso massivo e inadequado de antibióticos favorece e acelera a disseminação de bactérias resistentes, não apenas em ambientes hospitalares, mas também no meio ambiente (TAYLOR et al., 2011; HOCQUET et al., 2016). Em 1973, Davies descobriu que a resistência bacteriana não estava restrita apenas a bactérias patogênicas, mas também podia ser encontrada em microrganismos ambientais (AMINOV, 2010; WRIGHT, 2010). A resistência bacteriana é estudada há mais de 100 anos com foco clínico, porém, apenas nas últimas décadas, estudos focados em resistência em organismos não patogênicos e/ou de ocorrência em ambientes (WRIGHT, 2005).

A disseminação de genes de resistência em ambientes pode dar-se de diversas maneiras, como apresentado na Figura 8.

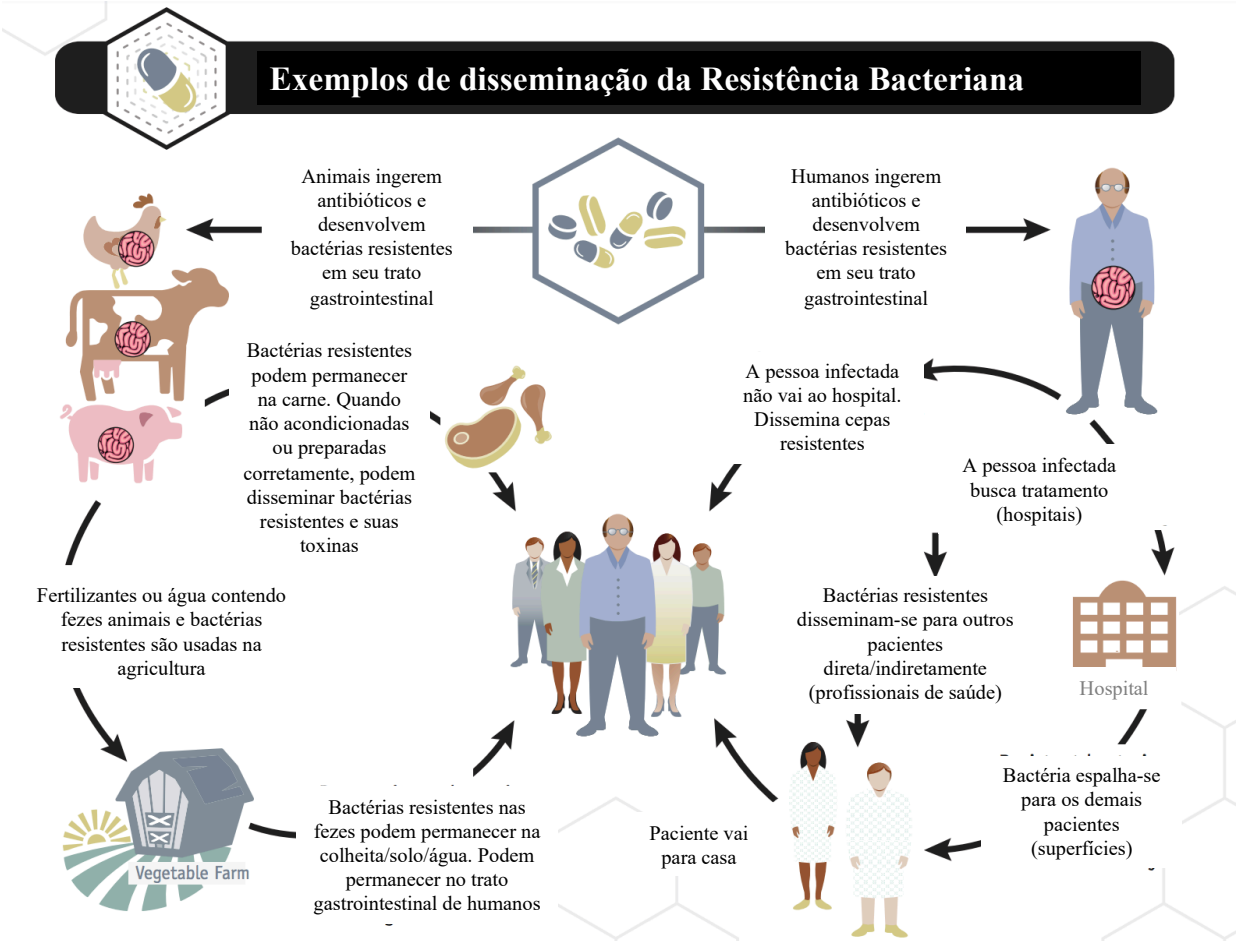

Figura 8 – Disseminação da resistência bacteriana entre humanos, agricultura e ambiente. Adaptado de CDC (2013).

Segundo Wright (2005), a transferência de genes de resistência para bactérias não patogênicas, pode formar o que chamamos de resistomas. Resistomas são *pools* de genes, que normalmente conferem resistências a antibióticos, presentes no ambiente, mas nem sempre associados a bactérias patogênicas (WRIGHT, 2005; MARTÍNEZ et al., 2014). Diversos estudos mostram a presença de genes de resistência em amostras de solo, e até presentes em amostras de ambientes extremos, demonstrando que naturalmente os genes de resistência a antibióticos podem estar presentes no ambiente, formando assim resistomas (MARTÍNEZ et al., 2014).

Desta maneira, o estudo de microrganismos resistentes em ambientes, faz-se extremamente necessário, especialmente tratando-se de *Enterobacteriales*, podendo-se entender sua possível relação com fatores ambientais e associados à diversidade do grupo.

2.3. Contaminação de Ambientes Costeiros

Ambientes costeiros concentram grande parte da população mundial (TIBBETS, 2002; ZAMPIERI et al., 2017), sendo intensamente impactados por atividades antrópicas, tais como o descarte de efluentes domésticos (SHIBATA et al., 2004; WHO, 2008; AL RASHIDI et al., 2015). O descarte de esgotos em corpos hídricos, incluindo rios e mares, eleva os níveis de contaminantes orgânicos, podendo carrear microrganismos patogênicos (WHO, 2008; OLIVEIRA & PINHATA, 2008; ANDRADE et al., 2015). Além de contaminantes orgânicos, certos contaminantes químicos também podem ser encontrados (*e.g.* antibióticos e pesticidas) (SCHAFHAUSER et al., 2018; O'FLAHERTY et al., 2019). Os contaminantes, uma vez em contato com os corpos hídricos, são dispersados por meio de correntes e ondas (ARAUJO et al., 2013; ANDRADE et al., 2015). Ademais, os contaminantes, sejam partículas inorgânicas ou orgânicas, podem permanecer suspensos na coluna de água e, posteriormente, depositar nos sedimentos e até em outros materiais, como plásticos (ARAUJO et al., 2013; O'FLAHERTY et al., 2019).

Efluentes domésticos e provenientes de locais extremamente seletivos, como hospitais e indústrias, podem levar ao aumento da distribuição e frequência de bactérias resistentes em diversos ambientes, tais como água doce e marinha (SCHWARTZ, 2003). Além do impacto gerado pela disposição indevida de efluentes, o aumento sazonal da população nas regiões costeiras durante o verão eleva a descarga orgânica nos corpos d'água (PIANETTI et al., 2004; SATO et al., 2005; OLIVEIRA & PINHATA, 2008, OLIVEIRA et al., 2009). Quando estes microrganismos atingem águas e areias de praias e regiões costeiras, expõem os banhistas a possibilidade de contrair doenças, entretanto a incidência destas doenças depende de uma variedade de fatores, tais como os níveis de poluição na água ou areia, a natureza e tempo de exposição, e as condições do sistema

imune do banhista (BARTRAM & REES, 2000). No caso das areias de praias e sedimentos, estes mostram-se ambientes mais favoráveis às bactérias, uma vez que apresentam proteção contra a luz solar, nutrientes e proteção contra predadores (ANDRADE et al., 2015; PIANETTI et al., 2004; DAVIES & BAVOR, 2000; DAVIES-COLLEY et al., 1999; VILLAR et al., 1999; DAVIES et al., 1995; SINTON et al., 1994). Diversos estudos demonstraram concentrações de microrganismos, incluindo bactérias patogénicas, mais elevadas em amostras de areia e sedimentos do que na coluna d'água (ANDRADE et al., 2015; WHITMAN et al., 2014; OLIVEIRA & PINHATA, 2008; MUDRYK, 2005; ALM et al., 2003; WHITMAN & NEVERS, 2003; PAPADAKIS et al., 1997).

Conforme citado anteriormente, a Organização Mundial da Saúde considera que o grande desafio para os próximos anos é a resistência a antibióticos, uma vez que afeta diretamente a saúde pública global, segurança alimentar, desenvolvimento e economia (WHO, 2014). Ademais, o estudo de bactérias ambientais, faz-se importante, para compreender como há a transmissão dos genes de resistência e formação de resistomas, não apenas em uma escala local, mas sim global. (WRIGHT, 2005; WALSH et a., 2005).

Em relação aos resíduos químicos, como é o caso das drogas terapêuticas (*e.g.* antibióticos) e metais pesados, a principal preocupação da sua presença no ambiente é seu potencial de selecionar espécies bacterianas resistentes, exercendo uma pressão seletiva na microbiota local (WITTE, 2000; XU et al., 2007). No caso dos antimicrobianos, um grande problema é que as espécies resistentes selecionadas e que, portanto apresentam genes de resistências aos antimicrobianos, podem transferir estes genes, se ligados a componentes celulares móveis, para bactérias da mesma espécie ou de espécies diferente, o que aumenta a disseminação de bactérias resistêntes no ambiente. Deste modo, os

ambientes marinhos que recebem efluentes domésticos sem o devido tratamento, muitas vezes sem qualquer tratamento, tornam-se extremamente seletivos para microbiota, tornando-se assim reservatórios potenciais de bactérias resistentes a antimicrobianos, contribuindo para disseminação de bactérias resistentes e para o risco à saúde da população que utiliza estas áreas para recreação, para obtenção de alimentos entre outras atividades (OLIVEIRA & PINHATA 2008; OLIVEIRA et al., 2009; ABESSA et al., 2012).

Sendo assim, torna-se de suma importância a análise da contaminação orgânica nos corpos hídricos. A avaliação da contaminação orgânica dá-se, principalmente, pela avaliação da densidade de microrganismos de origem fecal, como é o caso da *E. coli* e *Enterococcus* sp. (OLIVEIRA & PINHATA, 2008; ANDRADE et al., 2015). No Brasil, a Resolução CONAMA nº274 de 2000 (CONAMA, 2000) dispõe sobre a avaliação da qualidade ambiental de corpos hídricos para uso recreacional. A qualidade é medida por meio da avaliação das densidades de bactérias entéricas, como o grupo dos coliformes termotolerantes, mas principalmente *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. (CONAMA, 2000). A Resolução nº274 (CONAMA, 2000) preconiza que, em águas marinhas destinadas à balneabilidade, as densidades de *Escherichia coli* não devem ultrapassar 2000 UFC na última amostragem, e 400 UFC para *Enterococcus* sp. Caso estes valores encontrem-se acima das densidades citadas, o local é considerado com águas impróprias, sendo um potencial local de risco à saúde pública (OLIVEIRA & PINHATA, 2008; ANDRADE et al., 2015).

Outro efeito negativo da contaminação orgânica, especialmente por bactérias de origem fecal, é que estas influenciam diretamente na composição da microbiota local, representando um risco para a comunidade microbiana (CHIARETTI et al., 2014; LUNA

et al., 2018; SCIARRILLO et al., 2020). A pressão seletiva, especialmente de origem antrópica, e a competição entre os microrganismos, pode ocasionar uma diminuição da microbiota natural, que pode ser substituída por microrganismos patogênicos (JAHAN & STREZOV, 2017). Isto leva a alterações na comunidade microbiana, especialmente em ambientes costeiros, onde a pressão antrópica é maior, podendo gerar um desequilíbrio ambiental (AGER et al., 2010; JAHAN & STREZOV, 2017; SCIARRILLO et al., 2020). (AGER et al., 2010). Uma vez que os microrganismos são responsáveis por diversos processos biogeoquímicos em ambientes costeiros, a mudança na estrutura da comunidade pode ocasionar sérios desequilíbrios ecológicos, incluindo desbalanços nas ciclagens de nutrientes.

Quando analisamos a costa brasileira, pode-se observar que sua ocupação deu-se de forma desordenada, sem planejamento e sem a implementação de políticas de saneamento básico e/ou estratégias para mitigar os impactos gerados pelo homem (OLIVEIRA & PINHATA 2008; ARAUJO et al., 2013; ANDRADE et al., 2015; GIMILIANI et al., 2016; KNAPP et al., 2017). Sendo assim, é de suma importância o estudo da composição microbiana na costa brasileira, para compreender a relação entre os impactos antrópicos e a microbiota. Outro ponto importante, é compreender a presença de possíveis resistomas, criados por pressão seletiva, que podem significar um sério risco à saúde pública, principalmente dos banhistas.

Desta maneira, há a hipótese de que locais com maior influência antrópica possuem sua diversidade bacteriana, especialmente a ordem *Enterobacteriales*, alterada. Além de que, com base no levantamento bibliográfico, áreas com forte influencia de efluentes domésticos, especialmente de locais seletivos (*e. g.* hospitais), podem criar resistomas e disseminar genes de resistência entre bactérias nativas e patogênicas.

3. OBJETIVO

3.1. *Objetivos Gerais*

O presente estudo teve como objetivo descrever a diversidade de *Enterobacteriales* presentes em ambientes marinhos e sua relação com a contaminação ambiental. Também objetivou em descrever e determinar o perfil de resistência das cepas isoladas nas áreas de estudo.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica dos compartimentos estudados através da determinação das densidades de *Escherichia coli e Enterococcus* sp.;
- Verificar a influência da contaminação orgânica na diversidade de *Enterobacteriales*
- Verificar o perfil de resistência, especialmente à carbapenêmicos, das cepas isoladas;
- Identificar o mecanismo de resistência das cepas positivas ao teste de disco sinergia (IPM-EDTA);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

O presente estudo foi conduzido em três áreas distintas ao longo do litoral do Estado de São Paulo (Figura 9), com diferentes graus de ação antrópica. Foram selecionadas as praias de (i) Ponta da Praia (Santos/SP); (ii) Baía do Araçá (São Sebastião/SP); e (iii) Praia da Fazenda (Ubatuba/SP). A fim de manter a homogeinedade dos dados amostrados, foram selecionados 5 pontos, georreferenciados (Tabela 11), por área de estudo. As coletas foram realizadas entre 2016 e 2018, em dois verões e dois invernos.

Figura 9 - Mapa com a localização dos três locais de coleta: Santos (Ponta da Praia e Porto de Santos); São Sebastião (Baía do Araçá); Ubatuba (Praia da Fazenda).

Table 11 - Pontos georreferenciados dos locais de coleta.

	Baía do Araçá (São Sebastião)			Ponta da Praia (Santos)			Praia da Fazenda (Ubatuba)		
	Abrev.	S	W	Abrev.	S	W	Abrev.	S	W
Ponto 1	A1	23°49'011	45°24'249	PP1	23°59'168	46°17'411	U1	23°21'477	44°50'406
Ponto 2	A2	23°48'431	45°24'273	PP2	23°59'172	46°17'451	U2	23°21'410	44°50'576
Ponto 3	A3	23°48'476	45°24'288	PP3	23°59'186	46°17'474	U3	23°21'370	44°50'095
Ponto 4	A4	23°48'498	45°24'287	PP4	23°59'205	46°17'508	U4	23°21'339	44°50'219
Ponto 5	A5	23°48'531	45°24'293	PP5	23°59'118	46°17'323	U5	23°21'290	44°50'389

4.1.1. Ponta da Praia e Porto de Santos (Santos – SP)

A Baixada Santista (Figura 10), encontra-se na costa sudeste do Estado de São Paulo, fazendo fronteira com a Serra do Mar e é composta por nove municípios: Santos, São Vicente, Praia Grande, Peruíbe, Mongaguá, Itanhaém, Guarujá, Bertioga e Cubatão (CORBISIER, 1991). O município de Santos foi selecionado para o estudo devido à sua importância econômica e elevado impacto antrópico. É uma região altamente povoada e próximo à cidade de São Paulo, maior cidade da América Latina. Além da sua importância econômica, Santos tem um aumento sazonal de sua população devido ao turismo de veraneio, onde há um aumento da população (ITALINI, 2014).

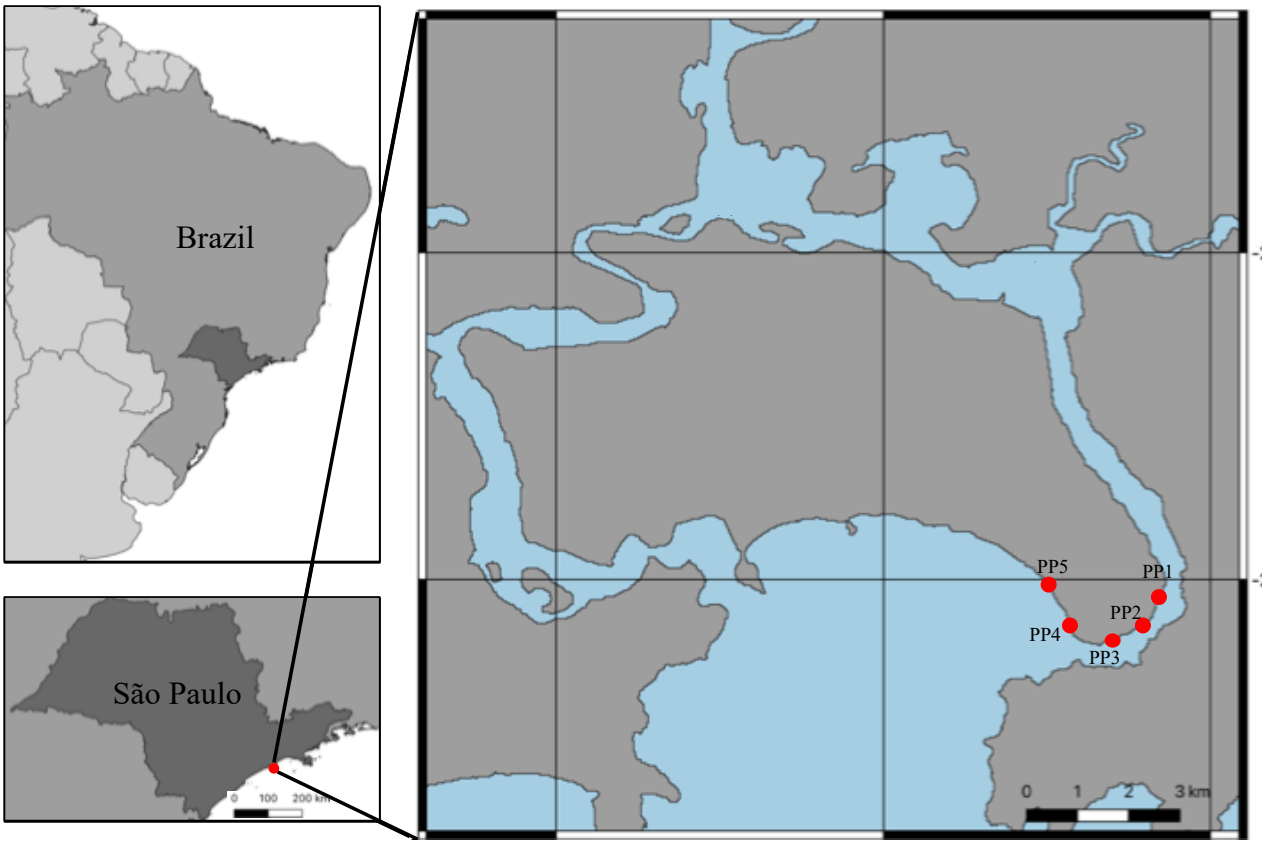

Figura 10 – Mapa da área de coleta na região da Baía de Santos. Em vermelho pontos de coleta (PP1 a PP5).

A cidade Santos esta situada em um dos pólos de desenvolvimento do país, possuindo grande população residente e diversas atividades econômicas de grande porte (*e.g.* transporte marítimo), além de conter ecossistemas de enorme importância como as áreas de manguezais na região do Canal do Porto de Santos, atualmente o porto mais importante do Hemisfério Sul (HARARI & CAMARGO, 1998; ALFREDINI, et al., 2015).

A Baía de Santos apresenta orientação para o sul e é exposta à ação de ondas originadas pelos sistemas frontais. Sua linha de costa é composta por um arco praial mais largo na região central e mais estreito próximo ao Canal do Porto de Santos, subdividido nas seguintes praias: Itararé (município de São Vicente), José Menino, Gonzaga, Boqueirão, Embaré, Aparecida e Ponta da Praia (FARINNACCIO et al., 2009). A Ponta da Praia localiza-se na entrada do Canal de Santos, além de ser um segmento praial estreito (ITALINI, 2014; CORBISIER, 1991).

O Porto de Santos localiza-se em uma área estuarina confinada, composta por mangues, com padrões hidrodinâmicos influeciados pelas marés e pela profundidade, esta última mantida pelas freqüentes dragagens (ALFREDINI, et al., 2015, LAMPARELLI et al., 2001). Esta região estuarina vem sendo impactada há anos pelas atividades industriais, portuárias e pela população, apresentando grandes quantidades de poluentes lançados e apresentando elevados níveis de contaminação e toxicidade nos sedimentos (CESAR et al., 2014; BURUAEM et al., 2013; CESAR et al., 2006; ABESSA, 2002; RACHID, 2002; LAMPARELLI et al., 2001).

No Brasil, estima-se que apenas 44% dos domicílios apresentam saneamento básico, o que contribui para que os esgotos urbanos sejam a principal causa de poluição marinha e estuarina no país (TOMMASI, 1987; IBGE, 2010; SAMPAIO, 2010). No caso da Baixada Santista, o município de Santos apresenta uma elevada taxa de coleta de esgoto, contando com 94% das residências. Entretanto, municípios próximos apresentam

valores mais reduzidos de coleta, como é o caso do município vizinho de São Vicente, que apresenta apenas 44% das residências com coleta de esgoto, o que pode gerar uma elevação na contaminação nos sistemas de canais e rios, e consequentemente, poluição das praias (BRAGA et al, 2000; CETESB, 2001; LIMA, 2003; ABESSA et al., 2005; GIANESELLA, 2006; SAMPAIO, 2008; SAMPAIO, 2010). Outro fator que influencia bastante esta área de estudo, é a presença do Emissário Submarino, que opera desde 1978, servindo ambos municípios, e que é uma fonte de contaminação para a área, uma vez que o esgoto não é tratado (OCCHIPINTI, 1972; RACHID, 2002; MOSER, 2002; ABESSA et al., 2005).

4.1.2. Baía do Araçá (São Sebastião – SP)

A Baía do Araçá (23º49'S; 45º24'W) (Figura 11) é uma pequena baía, com aproximadamente 750m de comprimento), localizada na área continental do município de São Sebastião, na porção mais central Canal de São Sebastião (AMARAL et al., 2010; SOARES et al., 2018).

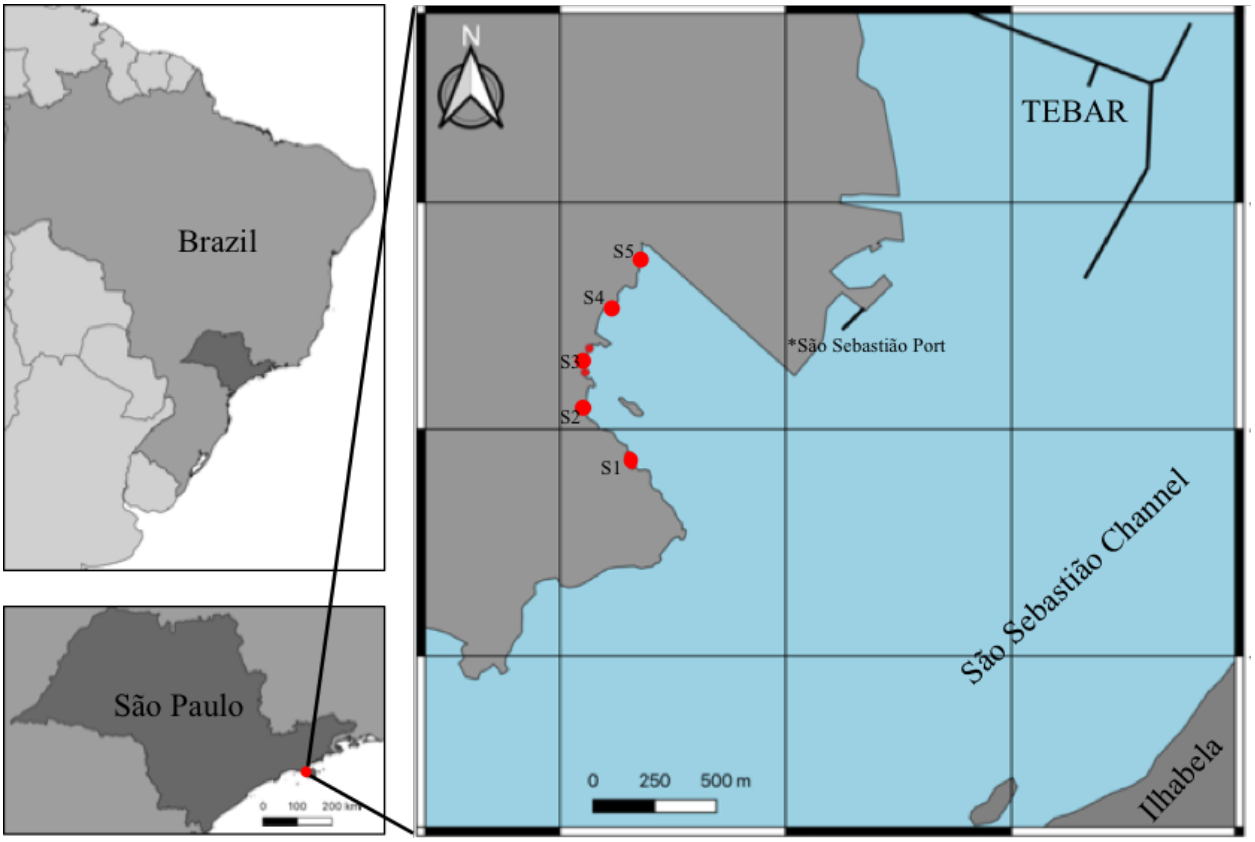

Figura 11 - Mapa da área da Baía do Araçá (São Sebastião/SP), localizada próxima ao Porto de São Sebastião e ao TEBAR. Pontos vermelhos representam os locais de coleta (S1–S5).

A área apresenta elevada complexidade biológica e constitui o último testemunho existente preservado das áreas de manguezal no trecho entre Bertioga e Ubatuba (SP). Geograficamente é caracterizada como uma pequena enseada, cuja formação deu-se durante a construção do Porto de São Sebastião (GUBITOSO et al., 2008), limitada por flancos rochosos que abrangem quatro praias (Deodato, Pernambuco, Germano e Topo), duas ilhotas (Pernambuco e Pedroso), uma extensa planície de fundo mole, inteiramente descoberta em períodos de maré baixa de sizígia, sendo que essa configuração impede que a região seja afetada diretamente pelos fatores hidrodinâmicos oriundos do Canal de São Sebastião (AMARAL et al., 2010). Devido à proximidade com a malha urbana e a ausência de infra-estrutura, especialmente sanitária, há muitos anos a região está exposta a diferentes tipos de ação antrópica (*e.g.*, ocupações irregulares, efluentes domésticos,

flutuações populacionais devido ao veraneio) (AMARAL et al., 2010; TOMINAGA et al., 2006). Ademais, nos últimos anos, os impactos antropogênicos na região veem aumentando (MUNIZ et al., 2015), especialmente por conta do emissário marinho, lançando efluentes domésticos na região, além da área sofrer forte influências do Porto de São Sebastião e do Terminal Aquaviário de São Sebastião (TEBAR - Petrobras), contribuindo para a contaminação na Baía do Araçá (ZAMPIERI et al., 2016).

4.1.3. Praia da Fazenda (Ubatuba – SP)

A Praia da Fazenda (23º 20'S; 44º 48'W) localiza-se nomunicípio de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo (Figura 12). Possui extensão de 3.2 km e limitada por extensos costões rochosos, além de ser uma praia exposta, sofrendo maior influência oceânica (STIEGLITZ et al., 2008; BARROS & TESSLER, 2003). Ademais, pode ser considerada como uma praia arenosa dissipativa, com ausência de impacto antropogênico, situada no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba, sendo uma área de preservação ambiental (MARIA et al., 2013).

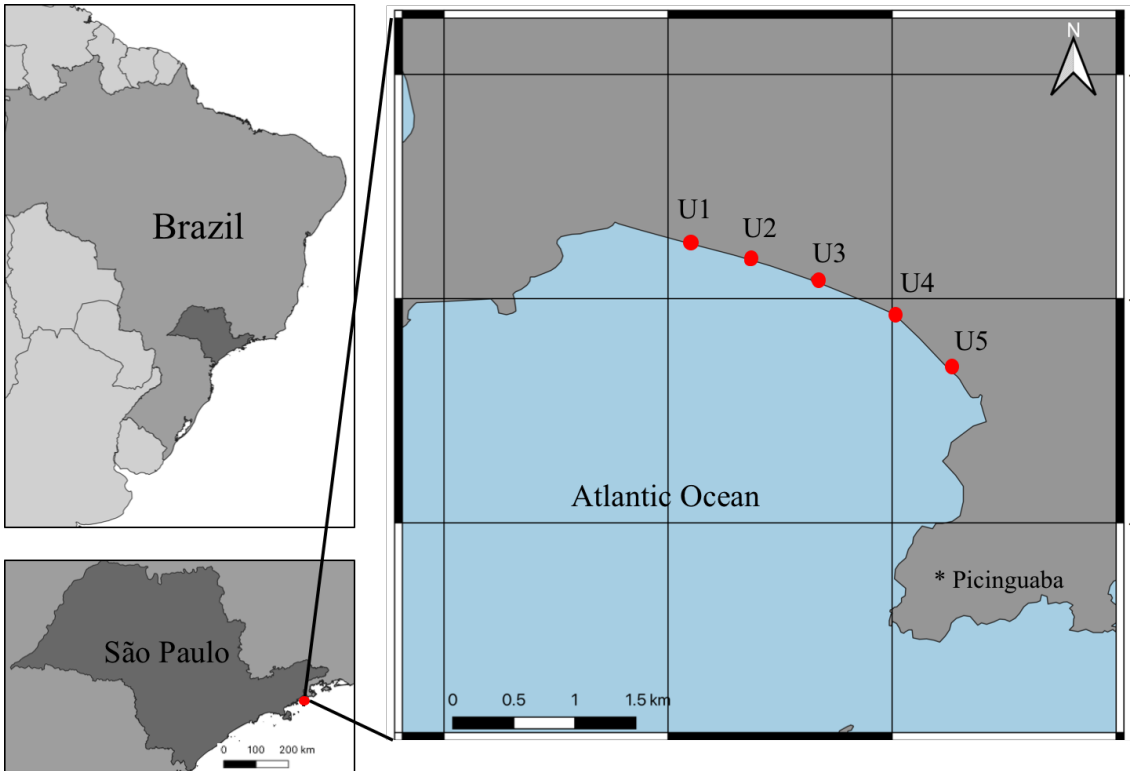

Figura 12 - Mapa da área de coleta Praia da Fazenda (Ubatuba/SP). Em vermelho, os pontos de coleta (U1 – U5) distribuídos ao longo da área de estudo.

4.2. Coleta e Processamento

Amostras de água e sedimento foram coletadas com intervalos de seis em três praias distintas, e com diferentes graus de interferência antropogênica: Baía de Santos (Santos/SP), Baía do Araçá (São Sebastião/SP) e Praia da Fazenda (Ubatuba/SP). Foram distribuídos 5 pontos de coleta em cada área de estudo, e georeferenciados com o auxílio de um equipamento de GPS (GPSMAP 70, Garmin).

Amostras de água foram coletadas em cada ponto de amostragem, na isóbata de 1m, com frascos plásticos estéreis. As amostras de sedimento foram coletadas, com o auxílio de espátulas estéreis, e acondicionadas em sacolas plásticas estéreis. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração (4 ºC) até seu processamento no laboratório de Microbiologia Marinha e Ambiental (Micromar – UNESP/IB CLP).

4.2.1. Dados Físico-Químicos

Durante as coletas, por meio de uma Sonda Multíparametros (Horiba U-50), foram mensurados os seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido (O.D.) e pH. A análise granulométrica dos sedimentos nos diferentes pontos de coleta foi realizada conforme metodologia de Suguio (1973), através do peneiramento com peneiras com o intervalo de 0.5 ø.

4.3. Qualidade Microbiológica

A avaliação da qualidade microbiológica deu-se pela Técnica de Membrana Filtrante (APHA, 2012) nas amostras de água e sedimento, onde foram avaliadas as densidades de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. conforme legislação vigente (CONAMA, 2000).

Para a remoção dos microrganismos aderidos aos grãos de areia, 20 g de sedimento foram homogeneizados em 180mL de solucão salina (NaCl 0,9%) e colocados no agitador Kline por 10 minutos, duas vezes, para que haja o desprendimento (OLIVEIRA & PINHATA, 2008). Em membranas de nitrato de celulose de 47mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade, foram filtrados os volumes de 5mL e 1mL do sobrenatante para as amostras de sedimento, e volumes de 50mL, 25mL e 10mL para as amostras de água.

4.3.1. Escherichia coli

Para as análises de *E. coli*, após a filtração, as membranas foram transferidas para placas Milipore®, contendo Ágar mTEC e incubadas a 36ºC (±1ºC) por 2 horas, e posteriormente incubadas a 44,5ºC (±1ºC) por 22 horas em banho maria (APHA, 2012). Após o período de incubação, as colônias foram submetidas ao teste de confirmação com substrato de uréia e vermelho de fenol (2%). As colônias que apresentaram com coloração

amarela, foram consideradas positivas para *Escherichia coli*. O resultado das densidades foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias em 100mL (UFC $100mL^{-1}$) para amostras de água, e em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC g^{-1}) para amostras de sedimento.

4.3.2. Enterococcus spp.

As análises de densidade de *Enterococcus* sp. deram-se através do posicionamento das membranas em placas Milipore® contendo Ágar mEnterococcus, e incubadas a 37º (±1ºC) por 24/48 horas. As colônias de coloração vermelho-amarronzada foram consideradas positivas para bactérias do gênero *Enterococcus*, e submetidas ao teste confirmatório em Caldo Enterococcosel. Para os testes confirmatório, as cepas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3mL de Caldo Enterococcosel, incubadas a 35ºC (±1º) por 24 horas, sendo considerados positivos os tubos que apresentaram enegrecimento. O resultado das densidades encontradas foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias em 100mL (UFC $100mL^{-1}$) para amostras de água, e em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC g^{-1}) para amostras de sedimento.

4.4. Diversidade de Enterobacteriales

4.4.1. Contagem, Isolamento e Purificação

Amostras de água e sedimento foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar MacConkey. Para tal, 100µL de amostra foram transferidos para placas contendo Ágar MacConkey e espalhadas por meio da técnica de *Spread Plate*. Concomitantemente, com o objetivo de isolar cepas resistentes à imipenem (IPM) para posteriores testes, 100µL de amostra foram inoculados em placas contendo Ágar MacConkey com imipenem (1µg mL^{-1}). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 ºC (±1 ºC) por 24 horas.

Após o crescimento seletivo, as colônias foram morfologicamente analisadas, foi realizada a contagem de colônias, sendo contagem total e por morfotipo. Posteriormente foram isoladas em placas contendo Ágar MacConkey, afim de obter-se colônias puras. Após sucessivos reisolamentos, afim de garantir a pureza dos isolados.

Para preservar as cepas isoladas, os microrganismos foram previamente crescidos em Caldo Soja Tripticaseína, a 37ºC (±1º C) por 18 horas, sob agitação de 180rpm. Após o período de incubação, 400µL de cultura foram transferidos para microtubos (Eppendorf) e acrescidos 200µL de glicerol (45%) previamente autoclavado. Os isolados foram armazenados em ultra-freezer, em triplicata, a – 80 ºC.

4.4.2. Identificação

4.4.2.1. Identificação Bioquímica

Previamente, as cepas foram analisadas quanto às características morfológicas, e posteriormente foram identificadas e confirmadas por meio de testes bioquímicos (Figura 13), utilizando Painel para Enterobactérias (Probac® - São Paulo/SP, Brasil) (ANEXO I) e Enterokit B (Probac® - São Paulo/SP, Brasil).

Figura 13 – Testes bioquímicos por meio de Painel para Enterobactérias (Probac®) para identificação das cepas isoladas. Cada poço demonstra um teste bioquímico para identificação de *Enterobacteriaceae.*

O Painel para Enterobactérias (Probac® -São Paulo/SP, Brasil) apresenta 25 provas bioquímicas para a identificação de *Enterobacteriales* (Anexo I), sendo elas: (1) Indol, para a verificação da presença de enzima triptofanase; (2) Voges Proskauer, para a identificação da via metabolica utilizada para a quebra da glicose; (3) Citrato de Simmons, para verificar a utilização do citrato; (4) H_2S, para verificar a liberação de enxofre; (5) Uréia, para verificar a presença de enzimas que hidrolizam a uréia; (6)Triptofano desaminase, verificar a produção de ácido indolpirúvico; (7 a 9) Lisina/Arginina/Ornitina, descarboxilação de aminoácido; (10) Malonato, para verificar a fonte de carbono; (11) Hidrólise da esculina; (12) ONPG, para verificar a atividade da β-D-galactosidase; (13) Oxidase; e (14 a 25) Fermentação de açúcares. Para a utilização do painel, conforme protocol fornecido pela empresa, previamente foram realizadas turvações em 3mL de Solução Inoculante, fornecida no kit, a 0.5 MacFarland. Foram inoculados 100μL da turvação em cada um dos poços da microplaca. Os painéis foram incubados em estufa bacteriológica à 35 (± 2 ºC) por 24 horas. Após o período de incubação, a interpretação dos testes bioquímicos deu-se baseado no manual fornecido no kit.

As cepas testadas com o Enterokit B (Probac® - São Paulo/SP, Brasil), foram inoculadas nos três meios (EPM, Mili e Citrato de Simmons), conforme manual fornecido pelo fabricante, e incubadas em estufa bacteriológica a 35 ºC (± 2 ºC) por 24 horas. A interpretação dos resutaltados deu-se conforme manual.

4.4.2.2. Identificação Molecular

As cepas confirmadas como pertencente ao grupo das Enterobactérias, foram submetidas a análises de identificação molecular. A extração do DNA deu-se por meio da técnica de fervura da cultura (DASHTI *et al*., 2009). As cepas, previamente isoladas e

puras, foram crescidas em tubos de microcentrífuga contendo 500µL de Caldo Soja Tripticaseína, a 37ºC (±1º C) por 18 horas, sob agitação de 180rpm. Após o período de incubação, os microtubos foram fervidos por 10 minutos e posteriormente centrifugados por 5 minutos a 13.500 rpm. O sobrenatante foi descartado e o pellet ressuspenso em 100µL de água MiliQ estéril.

A qualidade e integridade dos DNAs extraídos foi verificada em gel de agarose (1% em TAE 1x, contendo 5µL de Brometo de Etídeo). A amplificação do gene foi realizada por meio dos primers 27F e 1492R, previamente descritos (Anexo II).

Para a reação de polimerase em cadeia (PCR) foi utilizado um volume final de 50µL contendo: 2x Platinum SuperFi PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0.3 pmol/µL of de cada primer e 1µL of DNA por reação. O programa de amplificação consistiu em: denaturação inicial a 98ºC por 30 segundos; ciclo amplificação (30x) consistindo de denaturação por 10 segundos a 98ºC, anelamento a 56ºC por 10 segundos e extensão a 72 ºC por 50 segundos; extensão final a 72 ºC por 5 minutos. Os amplificados foram visualizados em gel de agarose (1% em TAE 1x, contendo 5µL de Brometo de Etídeo) (Figura 14). As bandas obtidas com aproximadamente 1360pb, foram cortadas do gel de agarose e purificadas utilizando o Kit NZY Gelpure (MB 01102 – NZYTech). Os produtos da amplificação, após purificação, foram analisados por meio de sequenciamento Sanger (Stabvida, Portugal).

Os cromatogramas e as sequências obtidas pelo sequenciamento de Sanger, foram analisados utilizando o software FinchTV 1.5.0 (Geospiza Research Team, 2012) e CLC Sequence Viewer 8.0 (Qiagen). A sequência de nucleotídeos obtida foi comparada com a base de dados do NCBI GenBank using the Blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).

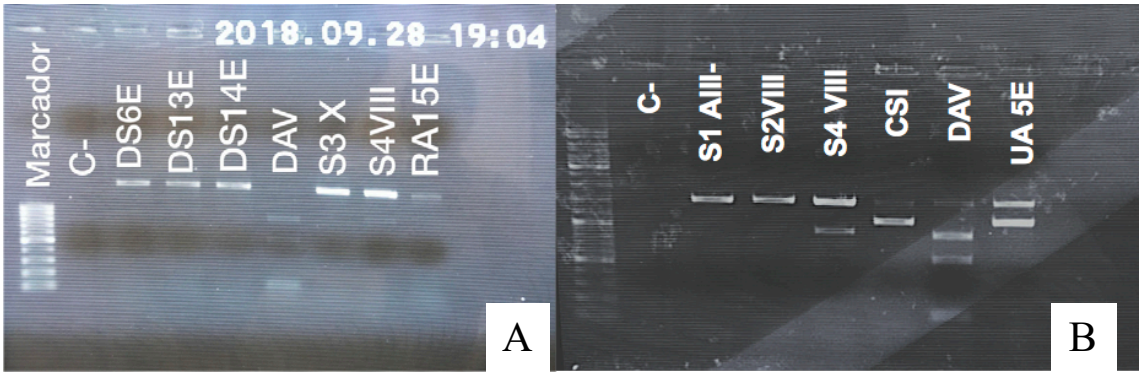

Figura 14 – A e B: Fotografia do gel de agarose (1%), demonstrando bandas (~1360pb) como resultado da amplificação utilizando os primers 27F e 1492R, para a identificação molecular dos microrganimos isolados. Acima indicando o marcador de peso molecular (Marcador), as cepas isoladas e o controle negativo (C-).

4.5. Teste de Suceptibilidade

4.5.1. Teste de Disco-difusão (Kirby-Bauer)

As colônias isoladas foram submetidas ao teste de disco-difusão (Kirby-Bauer), seguindo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019) e conforme Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) guidelines (BrCAST, 2019), de acordo com Portaria nº64 do Ministério da Saúde (Brasil, 2018). Com o auxílio de swabs estéreis, as colônias selecionadas foram utilizadas para a preparação de suspensões com turvação de 0,5 na escala MacFarland. As turvações foram semeadas em placas de Petri (Ø 120mm) contendo Ágar Mueller Hinton, deixando-se repousar por 15 minutos para o posterior posicionamento dos discos contendo os antibióticos. As placas foram incubadas por 18 horas a 37ºC (± 1ºC). Como controle foi utilizada a cepa *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Foram verificados os perfis de sensibilidade para os seguintes antibióticos: imipenem (IPM 10 µg), ertapenem (ERT 10 µg), meropenem (MPM 10 µg), fosfomicina (FOS 200 µg), ceftriaxona (CRO 30 µg), gentamicina (GEN 10 µg), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC 30 µg), tetraciclina (TET 30 µg),e norfloxacino (NOR 10 µg). Os

halos foram medidos em milímetros (mm) e a sensibilidade foi avaliada conforme normativa BrCAST (BrCAST, 2019), sendo os resultados expressos em: sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R). Para os antibióticos não contemplados na normativa BrCAST, foi utilizado os pontos de corte recomendados na MS100 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019).

Para as cepas consideradas positivas para o teste de disco sinergia Imipenem-EDTA, também foram testados os seguintes antibióticos: aztreonam (ATM 30µg), cefotaxime (5µg), cefoxitin (FOX 30µg), ceftazidime (10µg) e ampicilina (AMP 10µg).

4.5.2. Concentração Mínima Inibitória (CIM)

Para as cepas consideradas resistentes a pelo menos um dos carbapenêmicos, foi realizado, em triplicata, o teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM) para confirmar os perfis de resistência, de acordo com a normativa BrCAST (BrCAST, 2019). As cepas consideradas resistentes foram crescidas em tubos Falcon, contendo 5 mL de Caldo Mueller Hinton, e incubadas a 37ºC em agitador a 180rpm por 12 horas. As culturas tiveram suas densidades medidas em espectofotômetro, em comprimento de onda a 625nm e foram ajustadas para 0,5 na escala MacFarland. Os inóculos foram preparados a 5 x 10^6 células. Em placas de cultura de células (96 poços), foram pipetados 50µL de cultura bacteriana e 50µL de Caldo Mueller Hinton contendo o antibiótico testado (Figura 15). Foram testados os três carbapenêmicos anteriormente testados (IPM, ERT e MPM) em concentrações variando de 0 mg L^{-1} até 64 mg L^{-1}. As placas foram incubadas a 37ºC (± 1ºC) por 18 horas. Como controle positivo (C+) foi utilizada a cepa *Escherichia coli* (ATCC 25922).

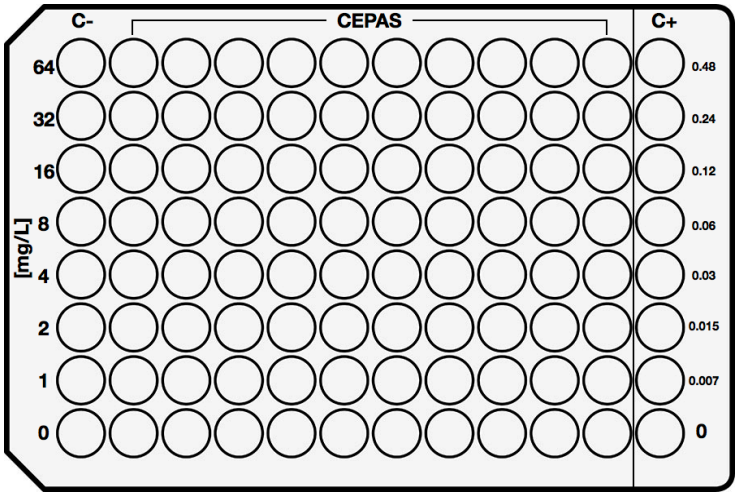

Figura 15 - Esquema de placa utilizado para os testes de CIM. À esqueda, valores referentes a concentração do carbapenêmico utilizado (0 a 64 mg L^{-1}). A última coluna representa os poços utilizados com a cepa controle (C+) *E. coli* ATCC 25922 e a concentração padrão, segundo BrCAST (2019).

4.5.3. Identificação de genes de resistência (Metalo β-lactamases)

4.5.3.1. Screening

Os isolados que apresentaram resistência ao imipenem, foram selecionados para o teste de disco sinergia de Imipenem (IPM)-EDTA (Yong et al., 2002).

Colônias foram selecionadas com o auxílio de swabs estéreis e utilizadas para a preparação de suspensões com turvação de 0.5 na escala MacFarland. As turvações foram inoculadas em placas de Petri (Ø 120mm) contendo Ágar Mueller Hinton. Posteriormente, foram posicionados dois discos de imipenem (IPM 10µg), sendo que um deles apresentava 10µL de EDTA 0.5M (pH 8,0) (Figura 16). As placas foram incubadas por 18 horas a 37ºC (± 1ºC). Os halos observados foram medidos, sendo consideradas positivas as placas que apresentavam halos 7mm maiores nos discos de IMP-EDTA em relação ao disco de IPM. Como controle foi utilizada a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

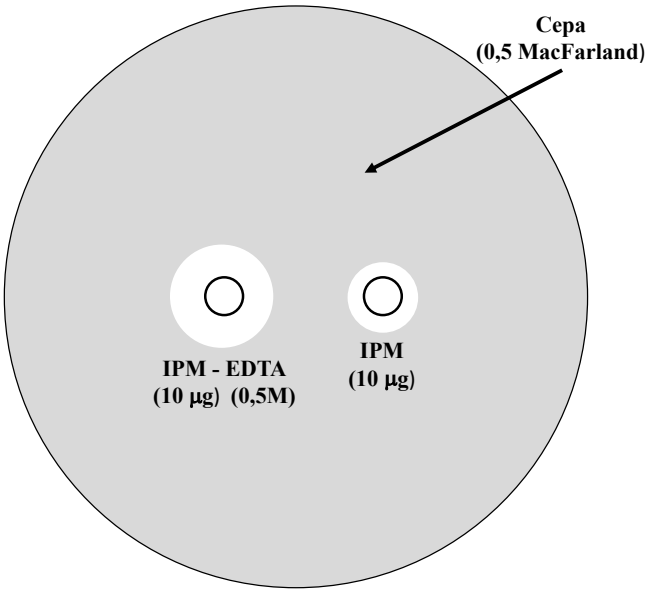

Figure 16 – Desenho representando a técnica de disco sinergia IPM-EDTA.

4.5.3.2. Genes de resistência para metallo β-lactamases

As cepas que apresentaram resultados positivos para o teste de disco sinergia IPM-EDTA, foram analisadas no Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade de Aveiro (LBM – UA/Portugal). Foram testadas para os seguintes genes com relação à produção de β-lactamases: *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IPM}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{GIM}$, *bla*$_{SIM}$, *bla*$_{DIM}$ e *bla*$_{SPM}$ (ANEXO II). As análises deram-se por meio de PCR (POIRREL et al., 2011).

A reação de amplificação foi realizada com volume final de 25µL (NZYTaq II 2x Green Master Mix (NZYTech) 0,2U/µL, MgCl2 50mM, dNTP 0,4mM, 0,3 pmol/µL de cada primer, NZYTaq II 5U/µL (NZYTech) e 1 µL de DNA). O programa de amplificação consistiu em: Denaturação inicial por 30 segundos a 95ºC; ciclo de amplificação (30x) composto por denaturação inicial por 30 segundos a 94ºC, anelamento por 30 segundos com temperaturas variando de acordo com cada enzima estudada (ANEXO II), e extensão a 72ºC por 5 minutos. Os amplificados foram visualizados em gel de agarose (1,5% em TAE 1x, contendo 5µL de Brometo de Etídeo).

Para cada enzima, foi utilizado como controle positivo enterobactérias produtoras das enzimas estudadas, e como controle negativo *Escherichia coli* ATCC 25922. As cepas controle positivo (C+) foram cedidas pelo laboratório MicroLab (Universidade de Aveiro/Portugal) e pela pesquisadora Profª Drª Luísa Peixe (Universidade do Porto/Portugal).

4.5.3.3. Genes de resistência para demais β-lactamases

Os isolados positivos para o teste de disco sinergia IPM-EDTA, também foram testados para os seguintes genes: bla_{KPC}, bla_{GES}, bla_{TEM}, bla_{CTX}, bla_{SHV}, bla_{OXA} e bla_{BIC} (ANEXO II). A extração do DNA deu-se por meio da técnica de fervura da cultura, conforme citado anteriormente (DASHTI et al., 2009).

A reação de amplificação foi realizada com volume final de 25µL (NZYTaq II 2x Green Master Mix (NZYTech) 0,2U/µL, MgCl2 50mM, dNTP 0,4mM, 0,3 pmol/µL de cada primer, NZYTaq II 5U/µL (NZYTech) e 1 µL de DNA). O programa de amplificação consistiu em: Denaturação inicial por 30 segundos a 95ºC; ciclo de amplificação (30x) composto por denaturação inicial por 30 segundos a 94ºC, anelamento por 30 segundos com temperaturas variando de acordo com cada enzima estudada (ANEXO II), e extensão a 72ºC por 5 minutos. Os amplificados foram visualizados em gel de agarose (1,5% em TAE 1x, contendo 5µL de Brometo de Etídeo). Os controles positivos (C+) foram cedidos pelo laboratório MicroLab (Universidade de Aveiro/Portugal) e pela pesquisadora Profª Drª Luísa Peixe (Universidade do Porto/Portugal).

4.5.3.4. Análise das Proteínas da Membrana Externa bacteriana (Omps)

A detecção e análise das proteínas da membrana externa (Outer Membrane Proteins – Omps), deu-se através de PCR, utilizando os seguintes primers: OmpA, OmpC, OmpF, OmpK35, OmpK36 e OmpK37 (ANEXO I). A extração do material genético (DNA), foi feita conforme Dashti et al. (2009), pela técnica de fervura de cultura. O PCR foi realizado com volume final de 25 µL (2x Platinum SuperFi PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0,3 pmol/µL de primer foward, 0,3 pmol/µL de primer reverse e 1µL de amostra de DNA) e o programa de amplificação consistiu em: Denaturação inicial por 30 segundos a 95ºC; ciclo de amplificação (30x) composto por denaturação por 30 segundos a 94ºC, anelamento por 30 segundos com temperaturas variando de acordo com cada enzima utilizadas (ANEXO I), e extensão a 72ºC por 45 segundos; extensão final a 72ºC por 5 minutos.

Conforme as demais reações, os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose a 1,5% de Brometo de Etídeo. As bandas geradas foram cortadas do gel e purificadas utilizando o Kit NZY Gelpure (MB 01102 – NZYTech). Após purificação, os amplificados foram analisados por meio de sequenciamento de Sanger (Stabvida, Portugal). Os cromatogramas e as sequências obtidos pelo sequenciamento, foram analisados utilizando o software FinchTV 1.5.0 (GEOSPIZA RESEARCH TEAM, 2012) e CLC Sequence Viewer 8.0 (Quiagen), e as sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com a base de dados do NCBI GenBank usando o Blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). O CLC Sequence Viewer foi utilizado para detectar possíveis mutações nas sequências das Omps estudadas.

4.6. Diversidade bacteriana e análises estatísticas

As espécies e gêneros encontrados nos locais de estudo foram analisados para a obtenção dos índices de diversidade, baseando-se na riqueza e a abundância. Foram utilizados o índice de *Shannon-Wiener* para avaliar a diversidade, e *Chao1* para estimar a riqueza da comunidade microbiana.

Foi utilizado o software Past 3.22 (HAMMER et al., 2011) e R 3.5.2 (R CORE TEAM, 2018) para as análises estatísticas.

A avaliação de homocedasticidade dos dados físico-químicos e biológicos foi feita com base no teste de Cochran's. Para a análise dos dados foram empregados os testes ANOVA (dados homogêneos) e teste de Turkey (dados heterogêneos) a fim de verificar a interação entre os componentes estudados.

Para realizar a análise do coeficiente de correlação de Spearman, os dados foram normalizados e os critérios como local de coleta (Santos, São Sebastião e Ubatuba), tipo de amostra (sedimento ou água) e período de amostragem (inverno e verão) foram preservados. Definiu-se, a posteriori, um recorte nos dados com a finalidade de analisar-se somente a correlação entre *E. coli* e *Enterococcus* spp. (avaliação da qualidade microbiológica/contaminação ambiental), e a densidade de bactérias patogênicas relevantes para saúde pública considerando-se apenas: *Citrobacter* spp.; *Enterobacter* spp.; *Escherichia coli*; *Escherichia fergusonii*; *Klebsiella* spp.; *Proteus mirabilis*; *Providencia* spp. e *Serratia marcescens*.

Para os dados de identidade da microbiota foi empregada a análise multivariada de componentes principais PCA (*Principal Components Analysis*) utilizando-se a distância de Hellinger como índice de similaridade (LEGENDRE & GALLANGHER, 2001). Para o cálculo da distância de Hellinger, estimou-se a distância euclidiana a partir da soma dos dados de abundância das espécies ou gêneros de bactérias em cada local de

amostragem, transformados pela raiz quadrada da proporção em relação ao total das amostragens (LEGENDRE & GALLANGHER, 2001).

5. RESULTADOS

5.1. *Contaminação Ambiental*

5.1.1. Dados Físico-Químicos

A Figuras 17, representam as variações de temperatura (ºC) (Figura 17A), salinidade (Figura 17B), oxigênio dissolvido (O.D.) (Figura 17C) e pH (Figura 17D).

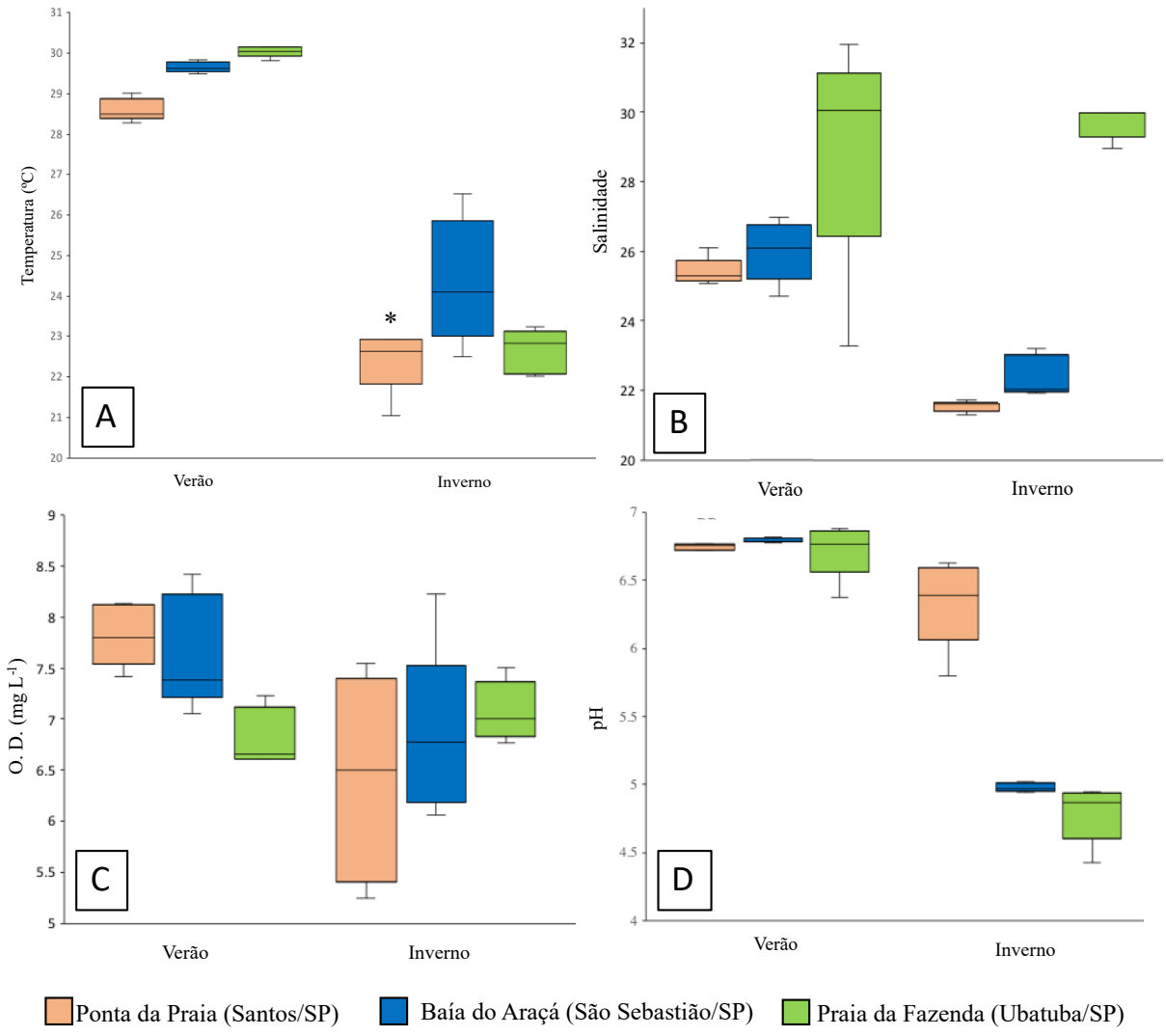

Figure 17 -Resultados obtidos para os três locais de coleta durante amostragens de verão e inverno. (A) Temperatura (ºC), (B) salinidade, (C) O.D e (D)pH. * Diferença estatística significativa ($p<0,05$).

As temperaturas registradas durante todo o período de coleta, nas três áreas de estudo, encontram-se representadas na Figura 17 A. A menor temperatura registrada foi

de 21.3 ºC em Santos no inverno, já a maior foi de 30.1 ºC registrada na Praia da Fazenda (Ubatuba/SP), na campanha de verão. Tanto no verão, quanto no inverno, é possível observar que Santos apresentou menores temperaturas quando comparado com as demais áreas de coleta. Na campanha de verão, a Praia da Fazenda (Ubatuba/SP) apresentou as maiores temperaturas, enquanto que a Baía do Araçá (São Sebastião/SP) apresentou maiores temperaturas na campanha de inverno. As médias de temperatura para o verão e inverno foram de 29.4 ºC (± 0.55) e 23.1 ºC (± 0.92), respectivamente. Estatísticamente, as temperaturas registradas no inverno foram significativamente ($p < 0.05$) menores em relação ao verão.

Com relação à salinidade (Figura 17 B), a média da salinidade para o verão foi de 26.83 (± 1.97) e para o inverno de 24.59 (± 3.43). Apesar de estatisticamente não haver diferença significativa nas áreas estudadas, nem entre as estações estudadas (verão e inverno), numericamente elas apresentaram-se diferentes, especialmente a Praia da Fazenda. A maior salinidade registrada foi de 30.3 na Praia da Fazenda (Ubatuba/SP) durante o verão. Já a menor salinidade (21.3) foi registrada em Santos durante o inverno. É possível constatar que a Praia da Fazenda (Ubatuba/SP) apresentou maiores salinidades quando comparada com as demais áreas estudadas.

Durante o período estudado, oxigênio dissolvido (O.D.) (Figura 12) apresentou valor médio de 7.43 mg L^{-1} (± 0.47) no verão e 6.78 mg L^{-1} (±0.56). No verão, na Baía do Araçá (A), foi registrado o maior valor 8.43 mg L^{-1}. Já em Santos, durante o inverno, foi registrado o menor valor para O.D. (5.25 mg L^{-1}). A Praia da Fazenda (U), ao contrário das demais áreas estudadas, apresentou valores maiores no inverno.

Os valores de pH obtidos durante todo o período estudado, nas três áreas: Santos, Baía do Araçá (São Sebastião/SP) e Praia da Fazenda (Ubatuba/SP), estão apresentados na Tabela 12 e representados na Figura 17 D. Os valores médios para o verão e inverno

foram 6.76 (± 0.059) e 5.40 (± 0.633), respectivamente. A Praia da Fazenda registrou o pH mais elevado (6.89) no verão e o mais baixo (4.43) no inverno. Observando a Figura 17 D, é possivel notar que os valores durante a campanha de verão permaneceram muito próximos nas três áreas de estudo. Contudo, Santos apresentou valores relativamente mais elevados no inverno, quando comparado com as demais áreas. Durante o período estudado, não foi registrada diferença significativa ($p < 0.05$) entre os locais estudados, nem entre as duas estações do ano.

5.1.1.1. Ponta da Praia e Porto de Santos (Santos/SP)

Os dados físico-químicos obtidos estão apresentados na Tabela 12. A temperatura média para o verão foi de 28.6 ºC (± 0.2 ºC), enquanto que para o inverno a temperatura média foi de 22.4 ºC (± 0.6 ºC). O ponto PP4 apresentou no verão a maior temperatura medida (29 ºC), porém ainda sim inferior as demais áreas de estudo, quando comparado com o mesmo período.

O pH teve média de 6.76 (± 0.02) e 6.34 (± 0.23) para os períodos de verão e inverno, respectivamente. Os maiores valores (6.78) de pH foram observados nos pontos PP3 e PP4 no período do verão, entretanto o menor valor obtido (6.33) foi no período de inverno no ponto PP3. A salinidade média para o verão foi de 25.42 (±0.272) e para o inverno 21.54 (±0.112). A maior salinidade registrada (26.1) foi no ponto PP5 no verão, enquanto que o mesmo ponto apresentou a menor salinidade (21.3) durante inverno.

Durante o período de verão a média do O.D. foi de 7.82 mg L^{-1} (± 0.234), e para o período de inverno 6.43 mg L^{-1} (±0.008). Durante o verão, o ponto PP5 apresentou 8.13mg L^{-1}, sendo o maior valor para o período estudado. Enquanto que no inverno, o ponto PP2 apresentou o menor valor (5.25 mg L^{-1}). Não foi verificada diferença significativa ($p < 0.05$) entre as estações do ano, para todos os parâmetros testados.

Tabela 12 – Dados obtidos para temperature (Temp.), pH, salinidade, oxigênio dissolvido (O.D.), profundidade (Prof.) e matéria orgânica (M.O.), nas áreas de estudo.

			Temp. (ºC)	pH	Salinidade	O.D. (mg L^{-1})	Prof. (m)	M.O. (%)
Ponta da Praia (Santos/SP)	Verão	PP1	28.5	6.77	25.4	8.10	0.1	4.1
		PP2	28.3	6.73	25.1	7.80	0.15	2.1
		PP3	28.7	6.78	25.2	7.66	0.1	2.0
		PP4	29.0	6.78	25.3	7.42	0.1	1.6
		PP5	28.5	6.74	26.1	8.13	0.1	5.1
	Inverno	PP1	21.0	5.80	21.6	7.25	0.2	1.0
		PP2	22.9	6.40	21.7	5.25	0.1	1.0
		PP3	22.6	6.33	21.6	5.58	0.3	1.0
		PP4	22.9	6.56	21.5	6.50	0.2	1.1
		PP5	22.6	6.64	21.3	7.55	0.3	1.1
Araçá (São Sebastião/SP)	Verão	A1	29.5	6.78	27.0	8.43	0.1	0.4
		A2	29.8	6.82	24.7	7.06	0.1	2.9
		A3	29.8	6.79	25.7	7.36	0.05	1.4
		A4	29.6	6.81	26.1	7.39	0.1	2.7
		A5	29.6	6.79	26.6	8.03	0.1	2.5
	Inverno	A1	22.5	5.09	23.3	6.79	0.5	0.8
		A2	23.5	5.03	22.9	8.23	0.3	0.5
		A3	25.2	5.01	22.0	6.07	0.3	1.6
		A4	26.5	5.08	22.1	6.32	0.2	0.64
		A5	24.1	5.04	22.1	6.84	0.2	2.1
Praia da Fazenda (Ubatuba/SP)	Verão	U1	29.8	6.39	32.0	7.22	0.1	2.41
		U2	29.9	6.75	23.3	7.01	0.1	1.32
		U3	30.0	6.78	30.1	6.61	0.05	1.79
		U4	30.1	6.86	30.3	6.66	0.05	1.59
		U5	30.1	6.89	29.6	6.61	0.1	4.41
	Inverno	U1	22.0	4.43	29.0	7.50	0.2	1.01
		U2	22.1	4.77	29.7	6.89	0.25	1.05
		U3	23.0	4.87	30.0	7.01	0.3	1.29
		U4	22.8	4.94	30.0	7.22	0.35	1.18
		U5	23.2	4.95	30.0	6.77	0.3	1.24

5.1.1.2. Baía do Araçá (São Sebastião/SP)

Os dados físico-químicos obtidos para a Baía do Araçá estão representados no Tabela 12. A média das temperaturas foi de 29.7 ºC (± 0.1) para o verão, e de 24.4 ºC (±1.2) para a campanha de inverno. As maiores temperaturas (29.8 ºC) foram registradas durante o verão, nos pontos A2 e A3. Já a menor temperatura foi de 22.5 ºC, registrada no ponto A1 durante o período do inverno.

Analisando os dados de pH, é possível observar o maior valor (6.82) no ponto A2 durante o verão, e o menor valor (5.01) durante o inverno. As médias obtidas para o verão e para o inverno foram de 6.80 (± 0.01) e 5.05 (± 0.03), respectivamente.

A salinidade apresentou valores médios de 26.02 (± 0.66) para o verão e 22.48 (±0.50). Durante o verão, todos os pontos apresentaram valores maiores que os registrados no inverno. No ponto A1 foi registrada a maior salinidade (27.0), enquanto que a menor (22.0) foi registrada no inverno no ponto A3.

Os valores médios obtidos para oxigênio dissolvido (O.D.) foram de 7.65 mg L^{-1}(± 0.46) durante o verão, e 6.85 mg L^{-1} (± 0.00) no inverno. O ponto A1, durante o verão, apresentou o maior valor registrado de O.D., 8.43 mg L^{-1}. Já o ponto A3, durante o inverno, apresentou o menor valor, 6.07 mg L^{-1}.

A matéria orgânica (M.O.) teve média de 1.95% (± 0.84) no verão, e 1.13% (±0.58) no inverno. Ao contrário dos demais parâmetros medidos, a M.O. apresentou ambos, maior e menor valores, registrados durante o verão. O ponto A1 apresentou o menor valor (0.39%), enquanto que o ponto A2 apresentou o maior valor (2.85%).

5.1.1.3. Praia da Fazenda (Ubatuba/SP)

Os dados obtidos para os padrões físico-químicos para a área da Praia da Fazenda estão respresentados na Tabela 12. A área apresentou as maiores temperaturas, quando comparada com as demais áreas de coleta, obtendo uma média de 30 ºC (± 0.1) para o verão, e de 22.6 ºC (± 0.5) para o inverno. As maiores temperaturas (30.1 ºC) foram registradas no verão, nos pontos U4 e U5. Já a menor temperatura (22 ºC) foi registrada no ponto U1 durante a campanha de inverno.

O pH apresentou diferença entre as coletas de verão e inverno, porém não significativa ($p < 0.05$). A média para o verão foi de 6.73 (± 0.14) e de 4.79 (± 0.15) no inverno. O maior valor registrado foi de 6.89 no ponto U5, durante o verão, enquanto que durante o inverno foi registrado o menor valor (4.43), no ponto U1.

A salinidade teve pouca variação entre as estações (verão e inverno), e também entre os cinco pontos estudados. A salinidade média foi de 29.1 (± 2.3) para o verão e de 29.7 (± 0.3) para o inverno. Tanto o máximo (32.0), quanto o valor mínimo (23.3), foram registrados no verão, nos pontos U1 e U2, respectivamente. O O.D. teve valor médio de 6.82 mg L^{-1} (± 0.23) para o verão e 7.08 mg L^{-1} (± 0.23) no inverno. O maior valor obtido foi de 7.50 mg L^{-1} no inverno (U1), e o menor valor foi 6.61 mg L^{-1} durante o verão no ponto U3.

Com relação a matéria orgânica (M.O.), não houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre os meses de coleta. O verão apresentou valor médio de 2.30% (± 0.88%) e o inverno de 1.15% (±0.10). O ponto U5, durante o verão, apresentou o maior valor (4.41%), sendo quase quatro vezes maior do que o registrado em todos os pontos, durante todo o período estudado. Já o ponto U1, durante o inverno, apresentou o menor valor

registrado para M.O. (1.01%). Entretanto, este valor registrado, foi muito próximo aos valores registrados nos demais pontos no período de inverno.

5.1.2. Qualidade Microbiológica

Por meio da Técnica de Membrana Filtrante, as densidades obtidas para as três áreas de estudo e para *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* estão apresentadas nas Figura 18 e 19, respectivamente.

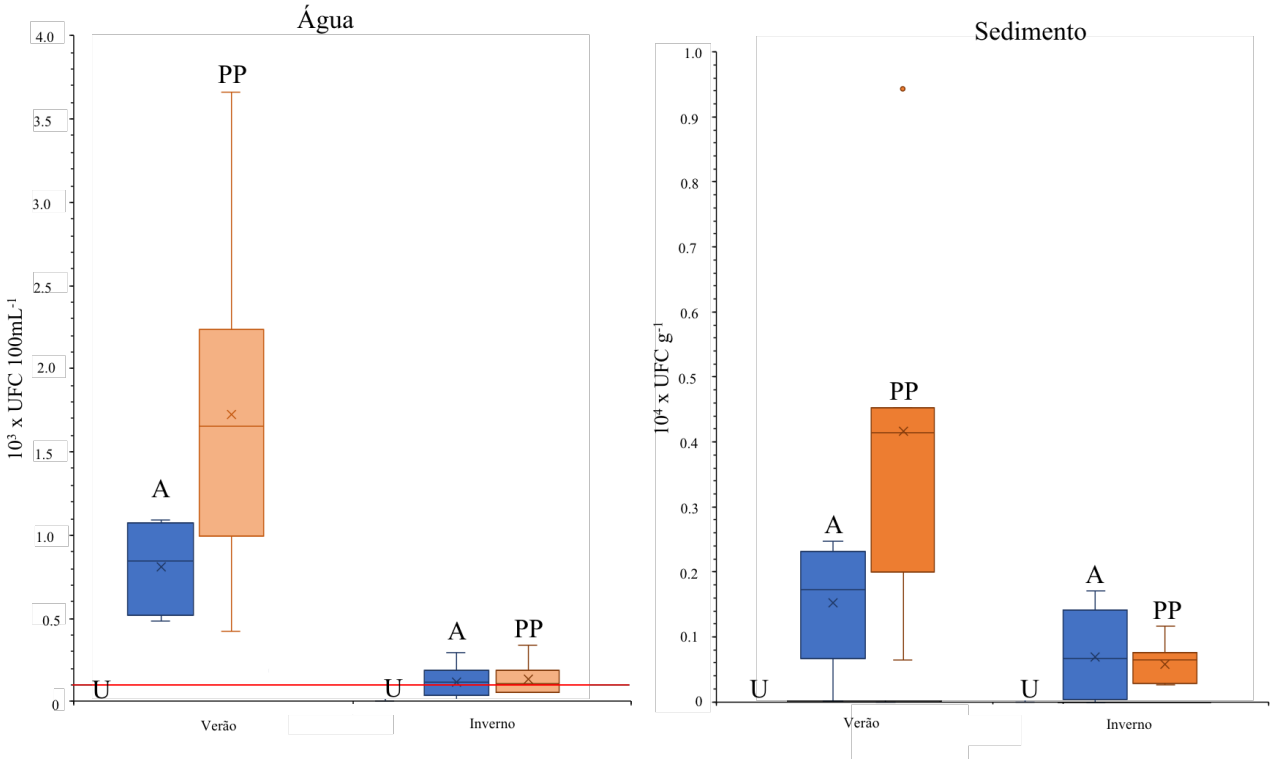

Figura 18 – Densidade de *Enterococcus* spp. em amostras de Água e Sedimento, nas três áreas de estudo: Ubatuba (U), Baía do Araçá (A) e Santos (PP). *Linha vermelha indicando o limite (400 UFC mL^{-1}), de acordo com a Resolução CONAMA 274/00, para amostras de água.

Como é possível observar na Figura 18, de um modo geral, as densidades de *Enterococcus* sp. foram superiores nas amostras de sedimento, quando comparado com as amostras de água. Durante o verão, as amostras de água na Baía do Araçá (A) e em Santos (PP), estavam em desconformidade com a Resolução CONAMA nº274/00

(CONAMA, 2000), apresentando densidades superiores a 400 UFC 100mL^{-1}. Já durante o período de inverno, apenas parte das amostras da Baía do Araçá e de Santos, estavam acima dos padrões estabelecidos (CONAMA, 2000).

Em todas as amostragens, Santos (PP) apresentou as densidades mais elevadas, especialmente no verão, período este que é considerado crítico para a cidade, uma vez que há um aumento sazonal da população. A Praia da Fazenda (U) não registrou o crescimento de microrganismos durante o estudo.

A Figura 19 apresenta as densidades de *Escherichia coli* obtidas durante o período de estudo, nas três áreas de amostragem. Conforme Resolução nº274 (CONAMA, 2000), para amostras de água, densidades superiores a 2000 UFC 100mL^{-1}, são consideradas como qualidade de água imprópria para a balneabilidade. Sendo assim, é possível observar que durante o inverno, todos os pontos de amostragem encontraram-se dentro dos limites. Contudo, durante o verão, um ponto da Baía do Araçá estava em desacordo com os limites.

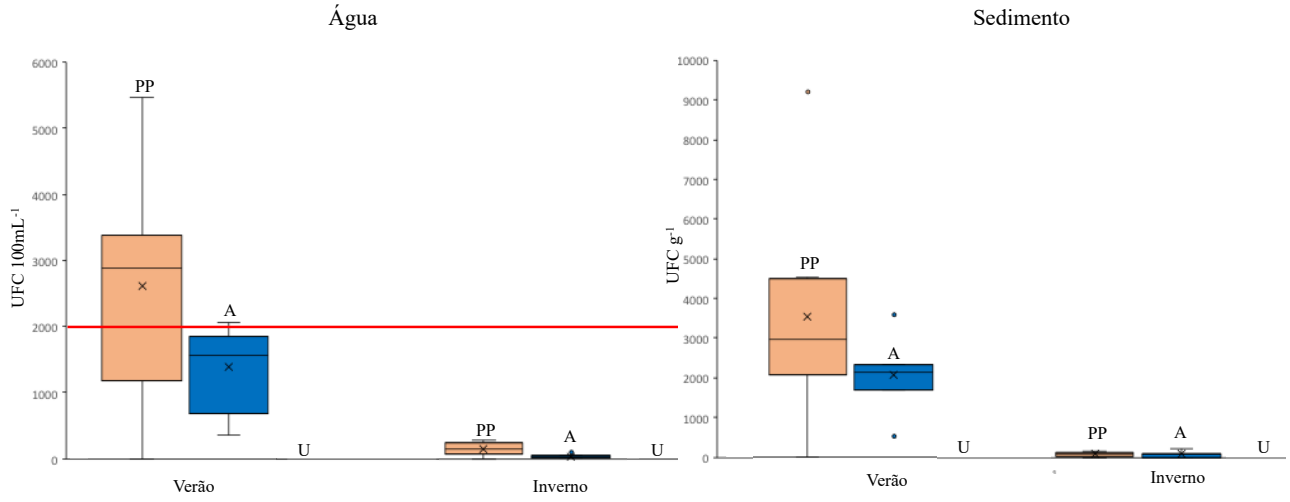

Figura 19 - Densidade de *Escherichia coli* em amostras de água e sedimento, nas três áreas de amostragem: Praia da Fazenda (U), Baía do Araçá (A) e Santos (PP). *Linha vermelha indicando o limite (2000 UFC mL^{-1}), de acordo com a Resolução CONAMA 274/00, para amostras de água.

De um modo geral, Santos apresentou maiores densidades quando comparado com as demais áreas de estudo, em todo o período estudado. Assim como o que foi observado com as densidades de *Enterococcus* sp., é possível também notar que as densidades bacterianas foram superiores no sedimento, quando comparado com as amostras de água.

5.1.2.1. Ponta da Praia e Porto de Santos (Santos/SP)

A Tabela 13 apresenta os valores obtidos para as densidades de *Enterococcus* spp. nas amostras de água e sedimento. É possível observar maiores densidades nas amostras coletadas no verão, tanto para água, quanto para sedimento. Entretanto, mesmo considerando as densidades obtidas no período do inverno, o sedimento demonstrou reter mais *Enterococcus* sp. quando comparado com a água.

As médias calculadas para as amostras de água foram de 1718.8 UFC $100mL^{-1}$. O valor máximo foi de 3660 UFC $100mL^{-1}$, detectado no ponto PP4 no período do verão, enquanto que o mínimo foi 60 UFC $100mL^{-1}$, registrado no ponto PP2 durante o inverno.

As densidades médias para as amostras de sedimento foram de 4498 UFC g^{-1} (verão) e 634 UFC g^{-1} (inverno). O maior valor registrado durante todo o período de estudo, inclusive considerando as demais áreas de estudo, foi no ponto PP2, durante o verão, onde foi registrada a densidade de 9420 UFC g^{-1}. Já o menor valor registrado, foi durante o inverno no ponto PP5, com uma densidade de 250 UFC g^{-1}.

Tabela 13 - Densidades de *Enterococcus* spp. obtidas nas coletas de Verão e Inverno, para amostras de água e sedimento na área de estudo de Santos.

	Água (UFC $100mL^{-1}$)		Sedimento (UFC g^{-1})	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
PP1	1180	340	4130	760
PP2	1756	60	9420	720
PP3	1584	130	3870	1160
PP4	3660	60	4440	280
PP5	414	90	630	250

A Tabela 14 apresenta as densidades de *E. coli* obtidas durante o período estudado, em amostras de água e sedimento. A média detectada para as amostras de água foi de 3342 UFC $100mL^{-1}$ durante o verão, e de 182 UFC $100mL^{-1}$ no inverno. A maior densidade foi registrada no ponto PP2 (5460 UFC $100mL^{-1}$) durante o verão. Já a menor densidade, para amostras de água, foi registrada no ponto PP5 (80 UFC $100mL^{-1}$), durante o inverno. Apenas as amostras coletadas no inverno apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº274/00, enquanto que nenhuma amostra coletada no verão estava dentro dos limites estabelecidos (2000 UFC $100mL^{-1}$).

Para as amostras de sedimento, temos uma média de 4390 UFC g^{-1} (verão) e de 92 UFC g^{-1} (inverno). Tanto para a água (5460 UFC $100mL^{-1}$), quanto para o sedimento (9180 UFC $100mL^{-1}$), o ponto PP2 apresentou os maiores valores quando comparado com os demais pontos da mesma área de estudo e das demais áreas estudadas. Apesar de a legislação brasileira não contemplar amostras de sedimento, é possível notar valores alarmantes detectados no sedimento durante o verão, sendo um grave risco à saúde pública.

Tabela 14 - Densidades de *Escherichia coli* obtidas nas coletas de Verão e Inverno, para amostras de água e sedimento na área de estudo de Santos.

	Água (UFC $100mL^{-1}$)		Sedimento (UFC g^{-1})	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
PP1	3400	280	4510	80
PP2	5460	250	9180	40
PP3	2560	190	2760	160
PP4	3210	110	3160	100
PP5	2080	80	2340	80

5.1.2.2. Baía do Araçá (São Sebastião/SP)

As densidades para *Enterococcus* sp. obtidas durante o estudo, encontram-se na Tabela 15. A média para o verão foi de 804.4 UFC $100mL^{-1}$ para amostras de água, e

1928 UFC g^{-1} para o sedimento. Já durante o inverno, foram registradas médias de 136 UFC 100mL^{-1} (água) e 816 UFC g^{-1} (sedimento). Todas as amostras obtidas em todos os pontos durante o verão, encontram-se em desacordo com a Resolução CONAMA nº274/00. A maior densidade registrada para água foi no ponto A2 (1088 UFC 100mL^{-1}) durante o verão, enquanto que a menor foi registrada também no ponto A2 (0 UFC 100mL^{-1}), porém no inverno.

Tabela 15 - Densidades de *Enterococcus* spp. obtidas nas coletas de verão e inverno, para amostras de água e sedimento na Baía do Araçá (São Sebastião/SP).

	Água (UFC 100mL^{-1})		Sedimento (UFC g^{-1})	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
A1	1064	160	1380	40
A2	1088	0	2440	60
A3	870	108	2420	1700
A4	480	50	1860	680
A5	520	290	1540	1600

Com relação as densidades obtidas nas amostras de sedimento, o ponto A2 registrou maior densidade (2440 UFC g^{-1}) durante o verão, e a menor densidade foi registrada no ponto A1 (40 UFC g^{-1}) no inverno. De uma maneira geral, todas as amostras de sedimento apresentaram densidades superiores as encontradas em amostras de água.

A Tabela 16 apresenta as densidades obtidas para *Escherichia coli*.

Tabela 16 - Densidade de *Escherichia coli*. detectados pela Técnica de Membrana Filtrante em amostras de água e sedimento, coletados na Baía do Araçá (São Sebastião/SP).

	Água (UFC 100mL^{-1})		Sedimento (UFC g^{-1})	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
A1	1850	8	3570	0
A2	2056	3	2324	0
A3	1688	40	2130	200
A4	1536	90	1920	80
A5	680	26	1660	80

Com relação às densidades de *E. coli*, os valores médios para o verão foram de 1562 UFC 100mL^{-1} (água) e 2320.8 UFC g^{-1} (sedimento). Durante o inverno, as densidades médias foram significativamente inferiores ao verão, sendo 33.4 UFC 100mL^{-1} (água) e 72 UFC

g^{-1} (sedimento). Na maioria das amostras de sedimento, foi possível observar valores mais elevados do que os encontrados na água. Todas as amostras de água, exceto A2 (verão), apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº274/00.

5.1.2.3. Praia da Fazenda (Ubatuba/SP)

Não foi registrado o crescimento de *Enterococcus* sp. durante todo o período estudado, em todos os pontos da Praia da Fazenda. Já com relação à densidade de *E. coli*, foi detectada a presença apenas em duas amostras de sedimento (U1 e U3) durante o período do verão. Em ambas amostras, foram registradas densidades de 10 UFC g^{-1}.

5.2. Enterobacteriales

5.2.1. Diversidade

A Figura 20 apresenta as densidades obtidas para *Enterobacteriales* nas três áreas de estudo, para amostras de água (UFC 100mL^{-1}) e sedimento (UFC g^{-1}). Conforme esperado, a Praia da Fazenda (U) não apresentou crescimento bacteriano em nenhuma das amostras coletadas.

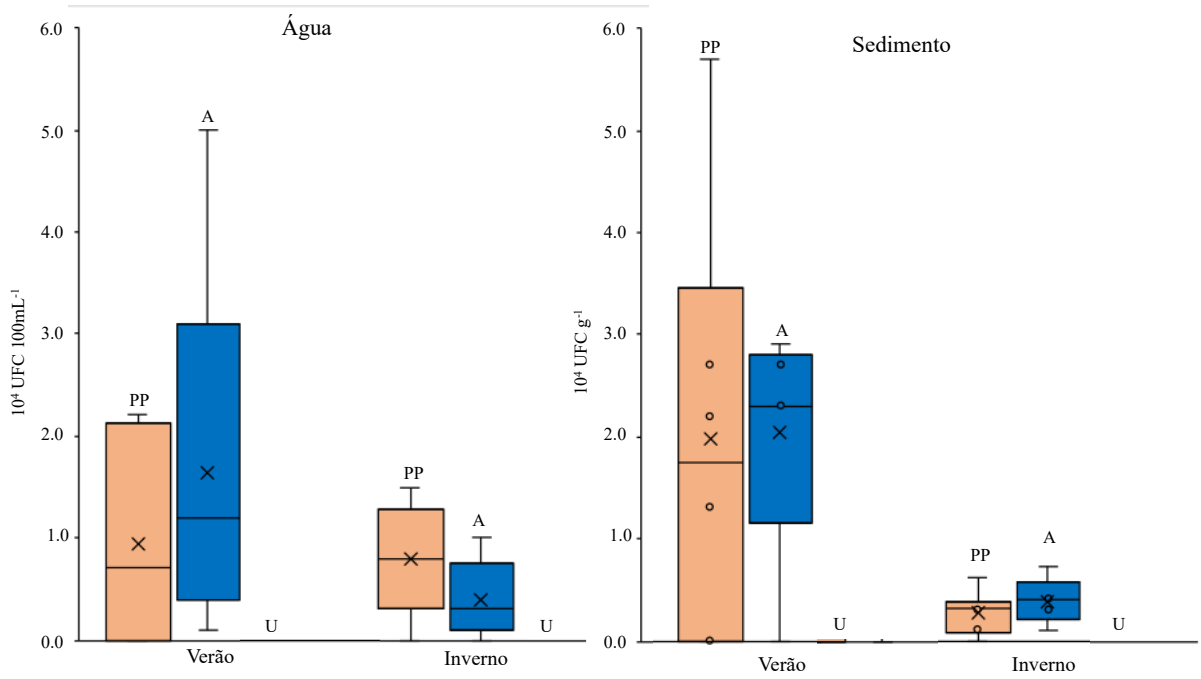

Figura 20 – Densidades de *Enterobacteriales* obtidas durante o estudo, em amostras de água (UFC 100mL^{-1}) e sedimento (UFC g^{-1}), nos três locais de coleta: Santos (PP), Baía do Araçá (A) e Praia da Fazenda (U).

Comparativamente, as amostras de sedimento apresentaram densidades significativamente maiores do que nas amostras de água, assim como os dados de densidade obtidos para *Enterococcus* sp. e *E. coli*. Durante o verão, as amostras de água apresentaram densidades médias de 1.64 10^4 (± 1.34) UFC 100mL^{-1} (Baía do Araçá) e de 1.14 10^4 (± 0.8) UFC 100mL^{-1} (Santos). Já para as amostras de água no inverno, foram

obtidas densidades médias de 0.4 10^4 (± 0.38) UFC 100mL^{-1} (Baía do Araçá), e de 0.94 10^4 (± 0.39) UFC 100mL^{-1} (Santos).

As densidades médias obtidas para *Enterobacteriales* em amostras do sedimento, durante a campanha de verão, foram de 2.04 10^4 (± 0.81) UFC g-1 (Baía do Araçá) e 2.38 10^4 (± 1.46) UFC g^{-1} (Santos). As densidades médias para o inverno foram significativamente ($p < 0,05$) menores do que no verão, 0.38 10^4 (± 0.14) UFC g^{-1} (Baía do Araçá) e 0.39 10^4(± 0.11) UFC g^{-1} (Santos). Conforme mencionado, a Praia da Fazenda não apresentou crescimento bacteriano.

As Tabelas 19 e 20 apresentam as bactérias da ordem *Enterobacteriales* isoladas durante o estudo, bem como sua densidade. Quando analisados os microrganismos isolados nas áreas duas áreas de estudo (Tabelas 19 e 20), é possível verificar uma maior presença de enterobactérias com potencial patogênico, como por exemplo *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* sp., nas amostras coletadas na Ponta da Praia (Santos/SP). Já nas amostras da Baía do Araçá (São Sebastião/SP), é possível observar uma maior densidade de algumas bactérias ambientais, como por exemplo *Pantoea* sp. e *Budvicia aquatica*.

Tabela 17 - Densidades de *Enterobacteriales* encontradas durante o verão, nas áreas da Baía do Araçá (A) e Santos (PP).

	Água		Sedimento	
Amostra	**Microrganismo**	**x 10^4 UFC**	**Microrganismo**	**x 10^4 UFC**
A1	–	0.0	*Klebsiella* sp.	0.1
A2	*Escherichia coli*	2.7	*Escherichia coli*	0.3
			Raoutella sp.	1.8
A3	*Raoutella* sp.	0.7	*Escherichia coli*	0.8
	Escherichia coli	0.1	*Serratia liquefaciens*	0.1
	Klebsiella sp.	0.4	*Raoutella* sp.	1.2
	Serratia marcescens	0.1	*Serratia marcescens*	0.1
A4	*Serratia marcescens*	0.1	*Pantoea* sp.	0.1
	Serratia liquefaciens	0.1		
	Raoutella sp.	2.0	*Serratia liquefaciens*	0.2
	Klebsiella sp.	0.1		
	Escherichia coli	0.9	*Raoutella* sp.	0.8
A5	*Enterobacter* sp.	3.3	–	0.0
	Pantoea sp.	2.4		
	Escherichia coli	0.1		
PP1	*Escherichia coli*	0.4	*Escherichia coli*	0.9
	Klebsiella sp.	1.4		
	Raoutella sp.	0.7	*Klebsiella* sp.	0.3
	Providencia sp.	0.2		
PP2	*Citrobacter* sp.	0.7	*Enterobacter* sp.	3.1
	Klebsiella sp.	0.8	*Raoutella* sp.	0.5
	Escherichia coli	1.2	*Escherichia coli*	1.4
PP3	–	0.0	*Klebsiella* sp.	0.1
			Escherichia coli	0.3
			Raoutella sp.	0.3
PP4	*Serratia liquefaciens*	0.1	*Raoutella* sp.	0.2
	Pantoea sp.	0.1		
	Enterobacter	0.8	*Escherichia coli*	1.0
	Klebsiella sp.	1.0		
	Escherichia coli	0.2		
PP5	*Escherichia coli*	0.5	*Raoutella* sp.	0.1
	Raoutella sp.	0.3		
	Citrobacter sp.	1.9		
	Pantoea sp.	1.9		

Tabela 18 – Densidades de *Enterobacteriales* encontradas durante o inverno, nas áreas da Baía do Araçá (A) e Santos (PP).

	Água		Sedimento	
Amostra	**Microrganismo**	**x 10^4 UFC**	**Microrganismo**	**x 10^4 UFC**
A1	*Raoutella* sp.	0.2	*Serratia marcescens*	0.1
	Budvicia aquatica	0.1	*Raoutella* sp.	0.2
A2	–	0.0	*Raoutella* sp.	0.1
			Rahnella sp.	0.1
A3	*Rahnella* sp.	0.4	*Proteus mirabilis*	0.7
	Escherichia coli	0.1	*Raoutella* sp.	2.1
A4	*Enterobacter* sp.	0.4	*Escherichia coli*	0.1
	Rahnella aquatilis	0.3	*Klebsiella* sp.	0.3
A5	*Enterobacter* sp.	0.1	*Escherichia coli*	0.3
	Raoutella sp.	1.7	*Raoutella* sp.	0.1
	Klebsiella sp.	0.2		
PP1	*Escherichia coli*	0.4	*Escherichia coli*	0.2
	Raoutella sp.	1.0		
	Budvicia aquatica	0.1		
PP2	*Escherichia coli*	0.2	*Escherichia coli*	0.2
	Raoutella sp.	0.9	*Raoutella* sp.	0.1
PP3	*Escherichia fergusonii*	0.3	*Leminorella* sp.	0.1
	Escherichia coli	0.5	*Escherichia coli*	0.3
	Klebsiella sp.	0.4	*Raoutella* sp.	0.2
PP4	*Proteus mirabilis*	0.2	*Escherichia coli*	0.3
	Budvicia aquatica	0.1		
	Escherichia coli	0.1		
	Klebsiella sp.	0.1		
PP5	*Escherichia coli*	0.1	*Leminorella* sp.	0.1
	Raoutella sp.	0.3		

A Figura 21 apresenta as espécies de *Enterobacteriales* isoladas em cada uma das áreas de estudo. Uma vez que não houve crescimento nas amostras da Praia da Fazenda (Ubatuba/SP), a área foi excluída das análises de diversidade e suceptibilidade.

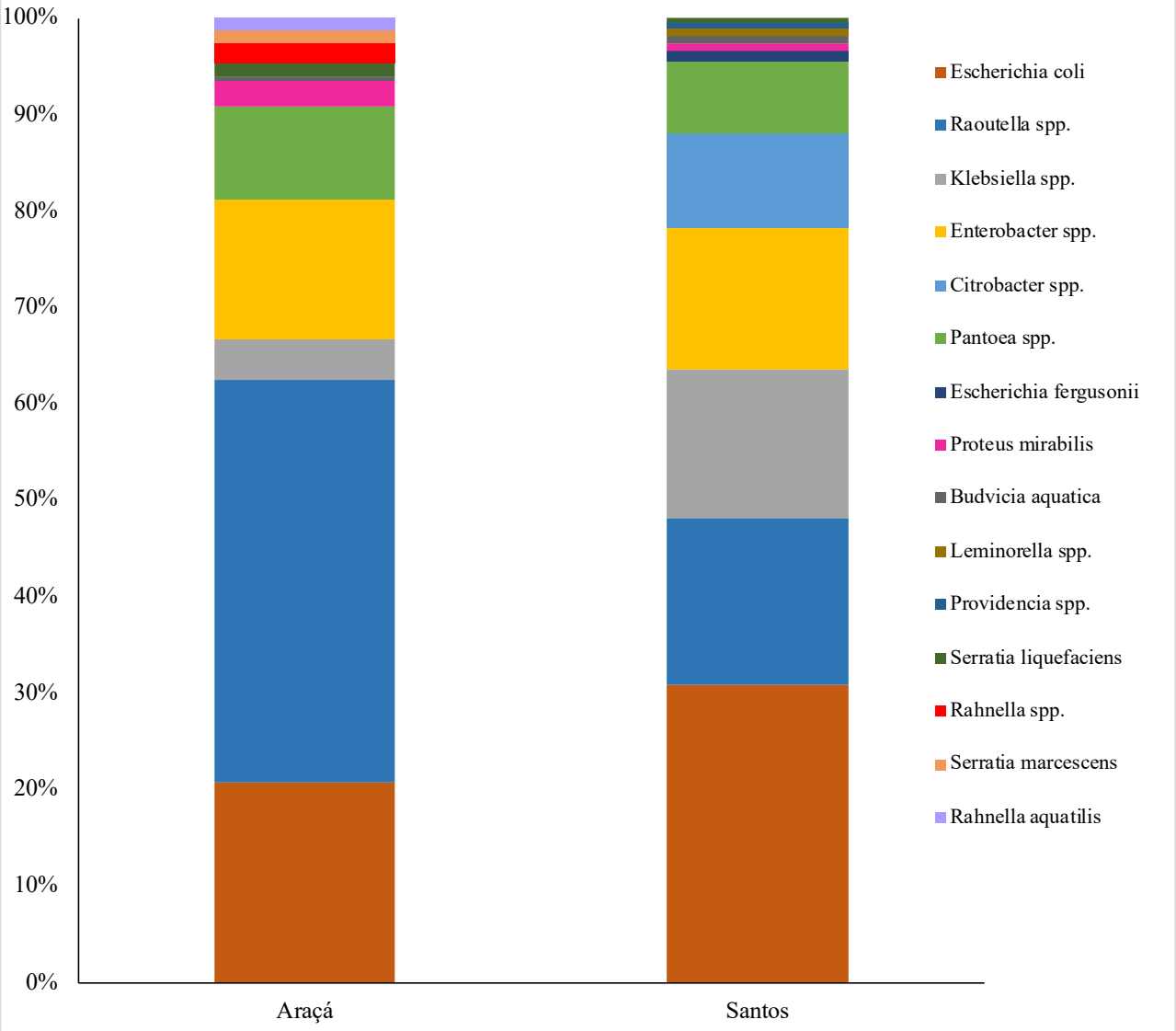

Figure 21 – Distribuição das espécies de Enterobacteriales nas áreas da Baía do Araçá (São Sebastião/SP) e Ponta da Praia (Santos/SP)

Analisando as amostras coletadas na Ponta da Praia (Santos/SP), é possível inferir que há uma maior quantidade de espécies potencialmente patogênicas, quando comparado com as amostras isoladas da Baía do Araçá. Em ambas áreas de estudo houve uma maior abundância de *Escherichia coli*.

No total foram isolados 12 gêneros diferentes, sendo eles: *Escherichia* spp., *Raoutella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Pantoea* spp., *Proteus* spp., *Budvicia* spp., *Leminorella* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp. e *Rahnella* spp. Dentre estes gêneros, são consideradas potencialmente patogênicas para humanos os seguintes gêneros: *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp.e *Serratia* spp.

Observa-se que a Baía do Araçá apresentou, em todo o período estudado, o registro de 11 gêneros diferentes. Durante o verão, foi possível observar um predomínio de *Escherichia coli* nas amostras água e sedimento, seguido por *Pantoea* spp. nas amostras de água e *Raoutella* spp. nas amostras de sedimento. Tanto *Pantoeae* spp., quanto *Raoutella* spp., são consideradas como bactérias ambientais. Similar à Baía do Araçá, as amostras de verão da Ponta da Praia (Santos/SP) apresentaram maior abundância de *E. coli*. Porém ao contrário do que ocorreu na Baía do Araçá, o segundo gênero mais abundante foi *Klebsiella* spp. nas amostras de água, e *Enterobacter* spp. nas amostras de sedimento.

Com relação aos dados obtidos para o inverno, em ambas as áreas, foi possível observar um aumento da abundância e de riqueza de espécies não patogênicas, como *Pantoea* spp. e *Budvicia* spp.

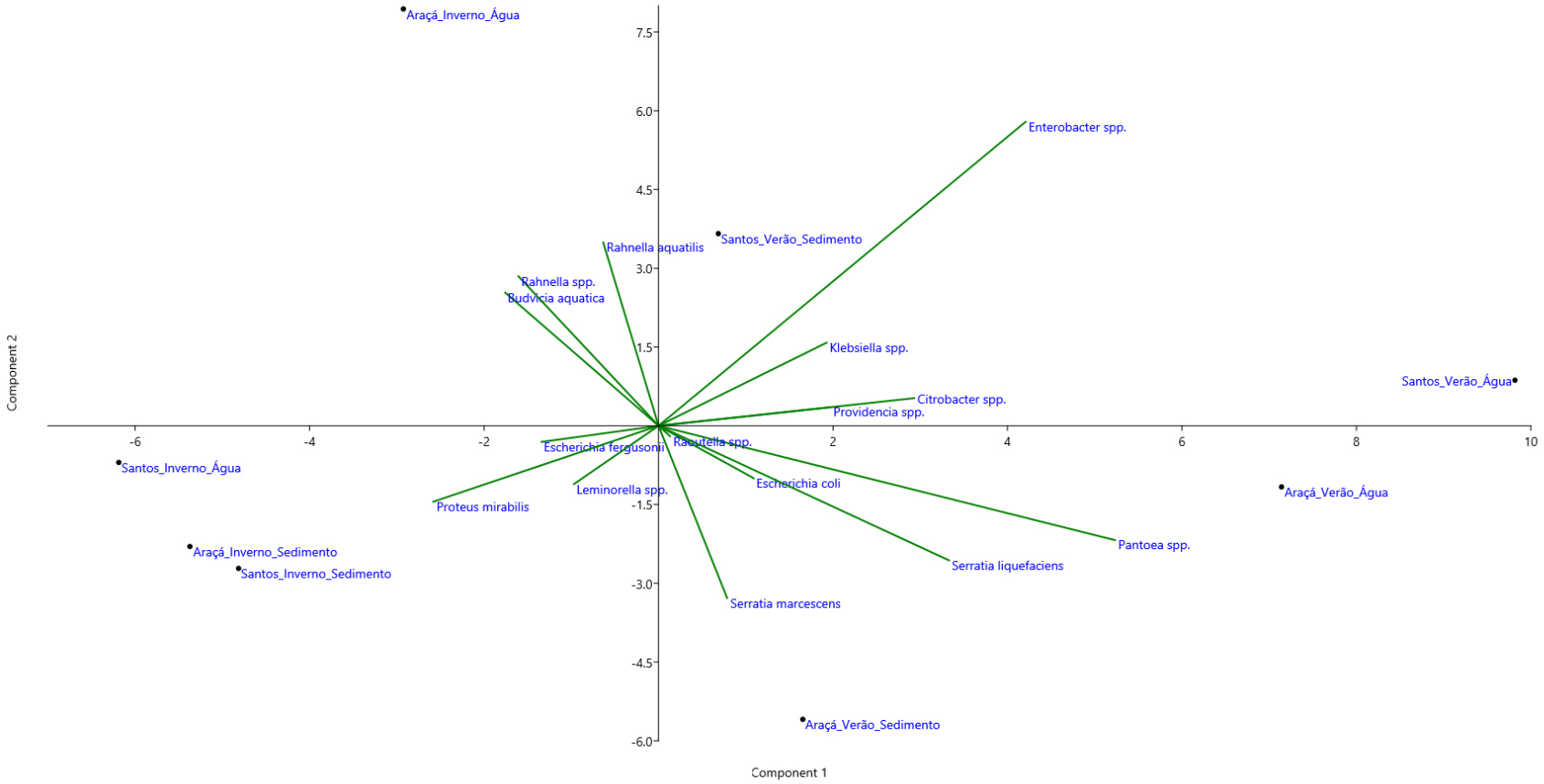

Figura 22 - Resultados da análise de PCA, correlacionando as bactérias isoladas com os locais de coleta.

A Figura 22 apresenta os resultados obtidos para a análise de PCA, onde foi possível observar uma forte correlação entre gêneros de bactérias possivelmente patogênicas e a área de Santos no período do verão. Enquanto que o inverno apresentou uma correlação com gêneros autóctones.

Para a análise de correlação de Spearman, foram verificadas a correlação entre a densidade total de bactécrias potencialmente patogênicas e a contaminação orgânica (*E. coli* e *Enterococcus* sp.) para a Ponta da Praia e a Baía do Araçá, respeitando-se o tipo de amostra (água e sedimento) e o período de amostra (inverno e verão). Verificou-se uma forte e significativa correlação entre a densidade de bactérias patogênicas com os níveis de *E. coli* (p=0,01) e *Enterococcus* sp. (p=0,01) no sedimento para o período de verão em Santos.

5.2.2. Suceptibilidade

5.2.2.1. Teste de Disco-Difusão

As Tabelas 21 e 22 apresentam os valores. Para a presente análise, foram consideradas apenas as cepas consideradas como resistentes, segundo as diretrizes do BrCAST (2019), e para tetraciclina (TET) foram consideradas as diretrizes do CLSI (2019).

Tabela 19 – Total de isolados de *Enterobacteriales* (n=158) na área na Baía do Araçá, durante todo o período de estudo, e a porcentagem de cepas resistentes (n). FOS: fosfomicina; ETP: ertapenem; MPM: meropenem; IPM: imipenem; TET: tetraciclina; AMC: amoxicilina + ácido clavulânico; GEN: gentamicina; CRO: ceftriaxona; NOR: norfloxacino. (*) Breakpoints utilizado baseado no CLSI (2019), uma vez que o BrCAST (2019) não contempla o antibiótico.

Cepas resistentes (%)

	A1 (n=26)		A2 (n=70)		A3 (n=38)		A4 (n=12)		A5 (n=12)	
	Water (n=12)	Sediment (n=14)	Water (n=10)	Sediment (n=60)	Water (n=8)	Sediment (n=30)	Water (n=6)	Sediment (n=6)	Water (n=6)	Sediment (n=6)
FOS	16.7 (2)	14.3 (2)	40.0 (4)	6.7 (4)	25.0 (2)	6.7 (2)	33.3 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
ETP	0.0 (0)	28.6 (4)	20.0 (2)	10.0 (6)	25.0 (2)	13.4 (4)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
MPM	0.0 (0)	14.3 (2)	20.0 (2)	3.3 (2)	25.0 (2)	6.7 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
IPM	50.0 (6)	28.6 (4)	40.0 (4)	26.7 (16)	50.0 (4)	26.7 (8)	0.0 (0)	0.0 (0)	66.7 (4)	0.0 (0)
TET*	0.0 (0)	42.9 (6)	0.0 (0)	3.3 (2)	0.0 (0)	33.3 (10)	33.3 (2)	0.0 (0)	33.3 (2)	0.0 (0)
AMC	66.7 (8)	47.1 (8)	40.0 (4)	13.4 (8)	25.0 (2)	13.4 (4)	0.0 (0)	0.0 (0)	33.3 (2)	0.0 (0)
GEN	0.0 (0)	57.1 (6)	40.0 (4)	6.7 (4)	0.0 (0)	26.7 (8)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
CRO	16.7 (2)	42.9 (6)	40.0 (4)	13.4 (8)	50.0 (4)	26.7 (8)	33.3 (2)	66.7 (4)	33.3 (2)	0.0 (0)
NOR	0.0 (0)	14.3 (6)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)

Tabela 20 – Total de isolados de *Enterobacteriales* (n=188) na área de Santos, durante todo o período de estudo, e a porcentagem de cepas resistentes (n).

	PP1 (n=58)		PP2 (n=44)		PP3 (n=25)		PP4 (n=28)		PP5 (n=34)	
	Water (n=24)	Sediment (n=34)	Water (n=18)	Sediment (n=26)	Water (n=25)	Sediment (n=0)	Water (n=20)	Sediment (n=8)	Water (n=14)	Sediment (n=20)
FOS	8.3 (1)	11.8 (4)	22.2 (4)	46.2 (12)	40.0 (10)	0.0 (0)	20.0 (4)	0.0 (0)	14.3 (2)	0.0 (0)
ETP	0.0 (0)	23.5 (8)	22.2 (4)	30.8 (8)	24.0 (6)	0.0 (0)	20.0 (4)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
MPM	8.3 (1)	5.9 (2)	11.1 (2)	15.4 (4)	8.0 (2)	0.0 (0)	30.0 (6)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
IPM	25.0 (3)	35.3 (12)	55.6 (10)	30.8 (8)	32.0 (8)	0.0 (0)	60.0 (12)	50.0 (4)	42.9 (6)	70.0 (14)
TET*	16.7 (2)	5.9 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	32.0 (8)	0.0 (0)	30.0 (6)	25.0 (2)	14.3 (2)	0.0 (0)
AMC	25.0 (3)	47.1 (16)	44.4 (8)	38.5 (10)	72.0 (18)	0.0 (0)	50.0 (10)	25.0 (2)	42.9 (6)	40.0 (8)
GEN	8.3 (1)	0.0 (0)	11.1 (2)	7.7 (2)	16.0 (4)	0.0 (0)	30.0 (6)	0.0 (0)	42.9 (6)	0.0 (0)
CRO	25.0 (3)	23.5 (8)	55.6 (10)	30.8 (8)	16.0 (4)	0.0 (0)	70.0 (14)	0.0 (0)	14.3 (2)	10.0 (2)
NOR	0.0 (0)	0.0 (0)	22.2 (4)	7.7 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	10.0 (2)	0.0 (0)	28.6 (4)	0.0 (0)

Analisando a Tabela 21, é possível verificar que foi detectada uma maior quantidade de bactérias resistentes no sedimento (114/158) do que na água (44/158). Os pontos A1, A2 e A3 apresentaram mais isolados, além de apresentar mais cepas resistentes.

Os carbapenêmicos, de um modo geral, apresentaram poucas cepas resistentes (ERT = 18; MPM = 10), exceto para IPM (n=46). Norfloxacino foi o antibiótico que os isolados apresentaram maior suceptibilidade, sendo apenas 6 resistentes (3.79%).

A Tabela 22 apresenta os valores registrados, com relação à resistência das cepas (n=188) isoladas nas amostras coletadas em Santos (PP). Dentre elas, 98 foram isoladas de amostras de água e 90 de amostras de sedimento, sendo a maioria resistente a três ou mais antibióticos. Dos 188 isolados, 43% (n=81) apresentaram resistência à AMC, 41% (n=77) foram resistentes à IPM, 27.1% (n=51) à CRO, 19.7% (n=37) foram resistentes à FOS, 16% (n=30) à ETP. Os antibióticos que apresentaram maior suceptibilidade aos antibióticos testados foram: TET e GEN com 11% de isolados resistentes à estes antibióticos; MPM com apenas 9% e NOR com 6.3% isolados resistentes.

Nos pontos PP1 e PP2, foram detectadas mais cepas multi-resistentes nas amostras de sedimento. Quanto aos carbapenêmicos, foi detectada resistência a imipenem (IPM) em todas as amostras coletadas. Entretanto nas amostras de sedimento dos pontos PP4 e PP5, não foi registrada resistência para ertapenem (ETP) e meropenem (MPM). As cefalosporinas. Norfloxacino foi o antibiótico que as cepas mais apresentaram suceptibilidade.

5.2.2.2. Cepas IPM-EDTA positivas

De um total de 331 isolados, 11 cepas (6.96%) foram positivas para o teste de disco sinergia IPM-EDTA. As cepas foram identificadas por métodos bioquímicos e moleculares (Tabela 23). Nota-se que a maioria foi isolada de amostras coletadas na área de Santos (72.73%), e dentre elas 62.5% isoladas de amostras de sedimento. Das 11 cepas positivas, 7 delas foram isoladas na campanha de verão.

Tabela 21 – Isolados positivos para o teste de disco sinergia IPM-EDTA.

Cepa	Microrganismo	Área (Amostra)	Período da coleta
1	*Budvicia aquatica*	Baía do Araçá (Água)	Inverno
2	*Lemiriorella grimondii*	Baía do Araçá (Sedimento)	Inverno
3	*Lemiriorella richardii*	Baía do Araçá (Sedimento)	Inverno
4	*Raoultella ornithinolytica*	Santos (Sedimento)	Verão
5	*Escherichia coli*	Santos (Água)	Inverno
6	*Raoultella plantiocola*	Santos (Sedimento)	Verão
7	*Klebsiella pneumoniae*	Santos (Água)	Verão
8	*Escherichia coli*	Santos (Água)	Verão
9	*Escherichia coli*	Santos (Sedimento)	Verão
10	*Enterobacter bugandensis*	Santos (Sedimento)	Verão
11	*Escherichia coli*	Santos (Sedimento)	Verão

Por meio da técnica de disco-difusão (Tabela 24), foi detectado que 18% das cepas foi resistente ao imipenem (IPM) e 82% apresentou perfil intermediário para este antibiótico. Quando comparados os demais carbapenêmicos testados, 82% das cepas isoladas foi resistente ao ertapenem (ERT), porém apenas 18% foram resistentes ao meropenem (MPM). Foi detectada 45% de cepas intermediariamente resistentes ao MPM.

Foi detectada resistentes à ampicilina (AMP) em todas as cepas estudadas. Entretanto, quando avaliada a resistência a amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), este valor cai para 72.7%.

Analisando as cefalosporinas testadas no presente estudo, 54.2% foram resistentes a cefotaxime (CTX), cefoxitin (FOX) e ceftriaxona (CRO). Já com relação à ceftazidima (CAZ), 45% dos isolados mostraram-se resistentes. Foi verificado que 72.7% das cepas foram resistentes a fosfomicina (FOS) e 54.5% à gentamicina (GEN). Foram detectadas poucas cepas resistentes aos seguintes antibióticos: TET (36.3%), ATM (9%) e NOR

(9%). Considerando o perfil de sensibilidade, ao menos 54.5% dos isolados são considerados como bactérias multi-resistentes.

Tabela 22 – Suceptibilidade das cepas IPM-EDTA positivas, testadas por meio de disco-difusão, de acordo com a normativa BrCAST (2019).

Antibióticos	μg	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ampicilina	10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amoxicilina + ác. clavulânico	30	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S
Aztreonam	30	I	S	R	S	I	I	S	I	I	S	S
Cefotaxima	5	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S
Cefoxitin	30	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	S
Ceftazidima	10	R	I	R	S	R	R	S	I	I	R	S
Ceftriaxona	30	R	R	S	R	S	S	R	I	R	R	S
Ertapenem	10	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R
Fosfomicina	200	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R
Gentamicina	10	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S
Imipenem	10	I	I	R	I	I	R	I	I	I	I	I
Meropenem	10	I	S	S	R	S	I	I	R	I	I	S
Norfloxacino	10	R	S	S	I	S	S	I	S	S	I	S
Tetraciclina*	30	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S

5.2.2.3. Concentração Mínima Inibitória (CIM)

Após a avaliação do perfil de sensibilidade das cepas IPM-EDTA positivas, para a confirmação dos valores obtidos para os carbapenêmicos, foi realizado o teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM), uma vez que oferecem melhor precisão, não gerando dúvidas. De modo geral, todas as cepas são resistentes aos três carbapenêmicos testados, exceto *B. aquatica* (1) que apresentou perfil intermediário (I) para IPM e MPM, e *K. pneumoniae* (7) que apresentou perfil intermediário (I) para MPM. Todas as onze cepas estudadas foram resistentes à ertapenem (Figura 25).

Tabela 23 – Suceptibilidade a carbapenêmicos testada por meio da técnica de Concentração Mínima Inibitória (CIM).

	CIM (μg mL^{-1})										
Antibióticos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ertapenem	8(R)	32(R)	32(R)	8(R)	32(R)	4(R)	16(R)	16(R)	32(R)	32(R)	32(R)
Imipenem	4(I)	16(R)	16(R)	16(R)	16(R)	16(R)	16(R)	8(R)	32(R)	16(R)	16(R)
Meropenem	8(I)	16(R)	32(R)	16(R)	16(R)	16(R)	8(I)	16(R)	16(R)	16(R)	64(R)

5.2.2.4. Análises de genes de resistência e proteínas da membrana externa (OMPs)

Os resultados foram negativos para os genes de resistência para metalo β-lactamases e para as demais β-lactamases (Anexo III). Sendo assim, inferiu-se que a resistência poderia depender de fatores estruturais bacterianos, como por exemplo ausência e/ou mutações em proteínas de membrana.

Foi verificada a presença de todas as seis Omps na cepa *L. grimondii* (2) (Tabela 26). Já os microrganismos *L. richardii* (3) and in *E. bugandensis* (10), não apresentaram nenhuma das Omps estudadas.

Tabela 24 – Presença (+) ou ausência (-) das Omps estudadas nas cepas IPM-EDTA positivas. (*) indica a presença de mutações.

	Proteínas da Membrana Externa (OMPs)					
	OmpK35	OmpK36	OmpK37	OmpA	OmpC	OmpF
(1) *B. aquatica*	+	-	-	+	+	+
(2) *L. grimondii*	+	+	+	+	+	+
(3) *L. richardii*	-	-	-	-	-	-
(4) *R. ornithinolytica*	-	-	-	+	+	+
(5) *E. coli*	+	-	-	+	-	-
(6) *R. plantiocola*	+	-	-	+	+	-
(7) *K. pneumoniae*	+*	+	+*	+	-	+
(8) *E. coli*	+	-	-	+	+	-
(9) *E. coli*	+*	+*	+	+	-	-
(10) *E. bugandensis*	-	-	-	-	-	-
(11) *E. coli*	+	-	-	+	+	+

A ausência de OmpK36 e OmpK 37 foi detectada nos isolados *B. aquatica* (1), *R. ornithinolytica* (4), *E. coli* (5), *E. coli* (8) e *E. coli* (11). Nas cepas *E. coli* (5), *K.*

pneumoniae (7) and *E. coli* (9), houve a ausência de OmpC e OmpF. Também foi detectada a ausência de OmpF em *R. plantiocola* (6).

Utilizando sequências previamente selecionadas no Genebank (NCBI), com o auxílio do software CLC Viewer 8.0 (Qiagen), comparações foram feitas e foi possível determinar mutações em diferentes proteínas da membrana externa. Foram detectadas mutações nas proteínas OmpK de *K. pneumoniae* (7) and *E. coli* (9).

No caso da cepa *K. pneumoniae* (7) foram detectadas as seguintes mutações na OmpK35: V311L, S325L, D328N e V332G. Também foi possível detectar uma mutação na sequencia de aminoácidos DVEAA, que sofreu mutação para HLQTT, localizado entre as posições 145 e 149 (Figura 23). Além de mutações na OmpK35, mutações foram detectadas mutações na OmpK37 (S171T, D277N, D279N, R322G and I340F).

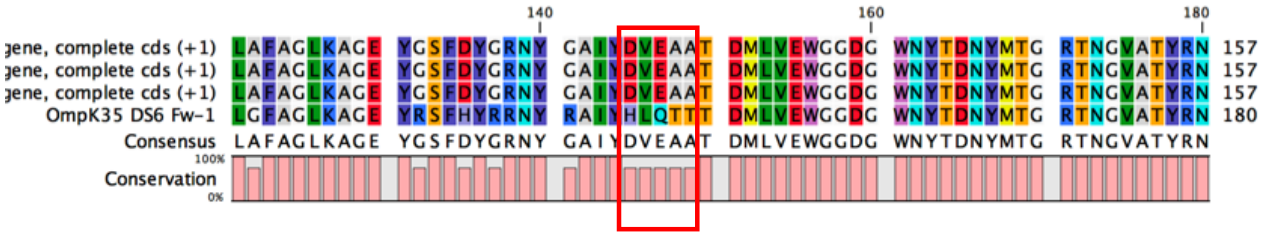

Figura 23 – Imagem mostrando, em vermelho, a mutação entre as posições 145 e 149. As 3 primeiras sequências são de genes OmpK35 obtidos no Genebank (NCBI) e a cepa *K. pneumoniae* é a 4ª sequência.

A cepa *E. coli* (9) apresentou mutações nas OmpK35 e OmpK36. Foram detectadas dez mutações na OmpK35, sendo elas: D73N, I97T, T116P, A122G, G132R, D135H, G137R, G141R, S234G and I264V. Enquanto que na OmpK36, foram detectadas 5 mutações e duas deleções. As deleções deram-se nas posições 216 (S) e 217 (P). Já as mutações, foram elas: L225Q, L236V, Y241F, Y250F e G257D.

6. DISCUSSÃO

Ambientes marinhos são extremamente importantes para o desenvolvimento de atividades comerciais (*e.g.* portuárias) e lazer, especialmente em áreas costeiras (ZAMPIERI et al., 2016). Porém, são locais que sofrem com o impacto antrópico, recebendo diversos tipos de contaminantes, como descargas de efluentes domésticos (SHIBATA et al., 2004; AL RASHDI et al., 2015; ANDRADE et al., 2015). Efluentes podem apresentar contaminantes orgânicos, como bactérias patogênicas, além de poderem apresentar uma carga de contaminantes inorgânicos, como antibióticos e seus metabólitos (MARTI et al., 2014; VIGNAROLI et al., 2013; ANDRADE et al., 2015).

Observando-se os resultados obtidos para contaminação orgânica, é possível verificar que, ao contrário da Praia da Fazenda, uma área não impactada, a Baía do Araçá e a Ponta da Praia apresentam contaminação oriunda de efluentes domésticos. Ademais, nota-se uma maior carga de contaminação orgânica durante o verão, que pode ser justificada pelo aumento da população nestas áreas devido ao turismo (veraneio), conqüentemente elevando a carga de efluentes domésticos (ANDRADE et al., 2015; ZAMPIERI et al., 2017).

Conforme demonstrado pela maior presença de bactérias patogênicas (*e.g. E. coli*, *Enterobacter* sp.), locais mais impactados tendem a apresentar uma maior densidade de bactérias patogênicas (OLIVEIRA & PINHATA, 2008). Com a elevação da carga orgânica, bactérias, incluindo bactérias patogênicas, podem ser carreadas e detectadas em níveis mais elevados (ANDRADE et al., 2015). Outro ponto importante, é que fatores físico químicos (*e.g.* pH, salinidade e luz solar) podem afetar a distribuição dos microrganismos em praias (DAVIES et al., 1995; DAVIES-COLEY et al., 1999; DAVIES & BAVOR, 2000; ANDRADE et al., 2015). Assim como no presente estudo, onde foi observada uma maior densidade de bactérias nos sedimentos, especialmente no

verão. Diversos estudos demonstram que o sedimento de praias pode conter densidades muito mais elevadas de bactérias do que amostras de água (ALM et al., 2003; OLIVEIRA & PINHATA, 2008; ANDRADE et al., 2015; ZAMPIERI et al., 2016). Este fato deve-se ao microambiente criado, naturalmente pelo sedimento, propiciando condições mais favoráveis aos microrganismos (SINTON et al., 1994; DAVIES-COLLEY et al., 1994; DAVIES et al., 1995; BRUNKE & FISCHER, 1999; DAVIES & BAVOR, 2000; ANDRADE et al., 2015; ZAMPIERI et al., 2017). No caso de antibióticos, estes costumam demorar mais para degradarem-se no sedimento do que na água, pois podem ligar-se às partículas, assim podem, também, afetar diretamente a microbiota nativa, gerando uma pressão seletiva (HALLING-SORENSEN et al., 1998; HIRSCH et al, 1999).

A maioria dos estudos foca em bactérias patogênicas, e apenas poucos avaliam a microbiota nativa, incluindo bactérias ambientais resistentes à antibióticos (WRIGHT, 2005; WRIGHT, 2010; CROFTS et al., 2017; WRIGHT, 2019;). Como foi observado, a presença destas bactérias nativas, com genes de resistência, são de extrema importância, uma vez que elas podem atuar como reservatórios de determinantes de resistência, especialmente antibióticos de última linha de tratamento, como o caso dos carbapenêmicos (MANAIA, 2017).

É sabido que algumas bactérias da ordem das *Enterobacteriales*, como *E. coli* e *K. pneumoniae*, são importantes patógenos humanos (MARAVIC et al., 2015). Nas últimas décadas, o uso de forma incorreta e excessiva de antibióticos, especialmente carbapenêmicos, fosfomicinas e polimixinas, têm levado a uma rápida disseminação de bactérias resistentes (ANDRADE et al., 2015; KELLY et al., 2017; ZAMPIERI et al., 2017; DURÃO et al., 2018). No Brasil, a grande maioria dos estudos focados em *Enterobacteriales* resistentes a carbapenêmicos está voltado para a área clínica

(FURTADO et al., 2007; GALES et al., 2012; SAMPAIO & GALES, 2016) e poucos avaliam a presença destes microrganismos no ambiente (ARAUJO et al., 2006). De acordo com ROSSI (2001), no Brasil, as regiões sul e sudeste apresentam resultados mais relevantes para bactérias resistentes, provavelmente correlacionado com diversas atividades econômicas (*e.g.* atividades portuárias) e elevada população. Similar ao observado no presente estudo, a maioria das *Enterobacteriaceae* isoladas da Lagoa Rodrigo de Freitas e Rio Carioca (Rio de Janeiro/RJ) eram resistentes à carbapenêmicos e apresentavam genes bla_{KPC}, bla_{GES} and $bla_{\text{OXA-48-like}}$ (ARAUJO et al., 2016).

Foram registrados, maiores taxas de resistência a ERT do que a IPM e MPM. O mesmo pôde ser observado em outros estudos, podendo ser explicado pela capacidade de penetração de cada antibiótico por meio das porinas (Woodford et al., 2007; Elliott et al., 2006; Rossi et al., 2006).

Apesar dos resultados positivos para o teste de disco-sinergia, nenhum gene que codifica carbapenemases foi detectado no presente estudo. Todas as cepas 11 cepas IPM-EDTA+ apresentaram resistência a ERT, enquanto que 90,9% foram resistentes a IPM, e 81,8% a MPM. Entretanto, por meio do teste de disco-difusão, 81,8% das cepas foram resistentes ao ERT, apenas 18,2% ao IPM e MPM. Consequentemente, os resultados para suceptibilidade a carbapenêmicos dependem do teste empregado (TENOVER et al., 2006; MAALEJ et al., 2011).

Resistências intermediárias foram registradas pelo CIM, especialmente para *K. pneumoniae* e *E. coli*, sem qualquer detecção de genes de resistência. Entretanto, o fenótipo possivelmente está relacionado com a perda de *Omps* ou mutações aleatórias nas proteínas, chamadas OmpK35 e OmpK36 (SHIN et al., 2012; TSAI et al, 2013; ADLER et al., 2015). Por exemplo, TSAI et al. (2013) demonstrou que a perda destas duas proteínas em *K. pneumoniae* levaram à elevação dos pontos de corte (breakpoints) em

ERT (32 mg/L) e MPM (8 mg/L), porém eram breakpoints tidos como limiares. Em *E. coli* podemos ter mutações em outras *Omps*, como as OmpC e OmpF, que estão associadas com a resistência a MPM e ERT (ADLER et al., 2016). A perda da proteína OmpK35 em *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentou associação com a resistência a cefoxitin (ANATHAN & SUBHA, 2005). Conforme apresentado nos resultados, a ausência de uma ou mais Omps detectados em *E. coli* (cepas S5, S8, S9 e S11), podem justificar o CIM intermediário/limiar para os carbapenêmicos testados. Também, pode ser inferido que as mutações detectadas em OmpK (*K. pneumoniae* S7) podem estar envolvidas no fenótipo de resistência a carbapenêmicos.

Com relação aos demais gêneros (*Budvicia* spp., *Leminorella* spp. e *Raoutella* spp.), há poucos estudos com relação aos mecanismos de resistência (BLEKHER et al., 2000; DALAMAGA et al., 2006; CASTANHEIRA et al., 2009; TOMCZAK & SMUSZKIEWICZ, 2014; LAM & SALIT, 2014; Sekowska; 2017). Cepas multirresistentes de *R. ornithinolytica* (CHUN et al., 2015; Haruki et al., 2014), *R. planticola* (LAM and SALIT, 2014), *B. aquatica* (TOMCZAK and SMUSZKIEWICZ, 2014), *Leminorella* spp (DALAMAGA et al., 2006; BLEKHER et al., 2000), porém nenhum gene ou mecanismo de resistência foi estudado. CASTANHEIRA et al. (2009) descreveu cepas de *R. plantiocola* e *R. ornithinolytica* multirresistentes e que apresentavam os genes TEM-1, SHV-7 and KPC.

Sendo assim, o presente estudo evidenciou a importância de políticas públicas integradas, principalmente com relação ao saneamento básico, e o risco que o descarte de efluentes domésticos e/ou seletivos podem exercer no meio ambiente. Tais impactos podem acarretar em graves problemas de saúde pública, além de poder negativamente afetar atividades econômicas desenvolvidas em ambientes costeiros, como o turismo e a pesca.

7. CONCLUSÕES

Zonas costeiras, especialmente no Brasil, sofrem graves impactos, especialmente devido ao descarte inadequado de efluentes e a falta de saneamento. Com base no presente estudo, foi possível detectar uma correlação entre a densidade de *Enterobacteriales* patogênicos e o grau de contaminação de determinados locais. Um maior aporte de contaminação orgânica foi detectado no verão, especialmente nas amostras coletadas em Santos, demonstrando a grande pressão antrópica durante o período de veraneio.

As cepas mais resistentes foram isoladas no verão e na Ponta da Praia (Santos/SP), sugerindo que a área sofre mais pressões seletivas, como atividades portuárias, elevada população e falta de estrutura sanitária que comporte e trate efluentes. Apesar de menos impactada, a Baía do Araçá demonstrou que também sofre com os impactos antrópicos, sobre tudo no veraneio. Enquanto que a Praia da Fazenda encontra-se preservada, provavelmente por encontrar-se dentro de um Parque Estadual, uma área de proteção ambiental.

Apesar de nenhum gene codificador de β-lactamases ter sido detectado, mutações importantes nas *Omps* foram detectadas. Tais mutações foram responsáveis pela conferência de resistência à carbapenêmicos em onze cepas estudadas.

O presente estudo reforça e corrobora que políticas públicas mais eficientes sejam implementadas na costa do Estado de São Paulo, uma vez que a formação de possíveis resistomas e a presença de bactérias patogênicas indicam degradação ambiental, representando um risco para a sociedade e economia.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; AHMAD, I., 2018. **First report of neonatal early-onset sepsis caused by multi-drug-resistant *Raoultella ornithinolytica***. Infection. 46(2), 275-277.

ABESSA, D. M. S., 2002. **Avaliação da Qualidade de Sedimentos do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil.** Tese de Doutorado. São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 124pp.

ABESSA, D. M. S., CARR, R. S., RACHID, B. R. F., SOUSA, E. C. P. M., HORTELANI, M. A., SARKIS, J. E., 2005. **Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments.** Marine Pollution Bulletin, 50, 875 - 885.

ABESSA, D. M. S., RACHID, B. R. F., MOSER, G. A. O., OLIVEIRA, A. F. C., 2012. **Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão.** O Mundo da Saúde, 36 (4), 643-661.

ADEOLU, M.; ALNAJAR, S.; NUSHAD, S.; Gupta, R., 2016. **Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 66, 5575-5599.

ALFREDINI, P., ARASAKI, E., MOREIRA, A. S., 2015. **Design Tide and Wave for Santos Offshore Port (Brazil) Considering Extreme Events in Climate Changing Scenario.** In: WEINTRIT, A., NEUMANN, T. *Information, Communication and Environment: Marine Navigation and Safety of Sea Transportation*. London: CRC Press, 147–152.

ALM, E., BURKE, J., SPAIN, A., 2003. **Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches.** Water Research, 37, 3978–3982.

ALMEIDA, N. C., BARROS, A. L. R., AROUCHE, S. P., FERRO, T. A. F., MORAES, F. H. R., NETO, V. M., FIGUEIREDO, P. M. S., 2012. **Detecção de enteropatógenos e teste de suceptibilidade a agentes sanitizantes de cepas diarreiogênicas de Escherichia coli isoladas das praias de São Luís Maranhão.** Revista de Patologia Tropical, 41 (3), 304–318.

ALNAJAR, S., GUPTA, R. S., 2017. **Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family *Enterobacteriaceae* and support the reclassification of several polyphyletic members of the family.** Infect Genet Evol 54: 108–127

ALVES, M. S.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M., 2007. **A case of severe pancreatitis complicated by *Raoultella planticola* infection.** Journal of Medical Microbiology. 56(5), 696-698.

AMARAL, A.C.Z.; MIGOTTO, A.E.; TURRA, A. & SCHAEFFER-NOVELLY, Y., 2010. **Araçá: biodiversidade, impactos e ameaças**. Biota Neotropica, 10, 1-47.

ANDO, T., NOGUCHI, S., ENOKIDA, T., YAMATO, A., KAGE, H., YAMAUCHI, Y., OKAZAKI, A., WAKABAYASHI, Y., MORIYA, K., YAMAUCHI, H., ONO, M., NAGASE, T., 2019. **Infectious aneurysm caused by *Citrobacter koseri* in an immunocompetent patient.** Internal Medicine, 58, 813–816.

ANDRADE, V. C., ZAMPIERI, B. B., BALLESTEROS, E. R., PINTO, A. B., OLIVEIRA, A. J. F. C., 2015. **Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands.** Environ. Monit. Assess., 187, 342.

ANDERSON, K. F.; LONSWAY, D. R.; RASHEED, J. K.; BIDDLE, J. et al., 2007. **Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*.** Journal of Clinical Microbiology. 45 (8). 2723.

APHA, American Public Health Association, 2012. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** APH, AWWA, WEF. 22th Edition. 1120p.

APUN, K., YUSOF, A. M., JUGANG, K., 2010. **Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds.** Int J Env Health Res, 9 (4), 285–292.

BARROS, M. O.; TESSLER, M. G., 2003. **Profile Changes on Fazenda, Puruba and Itamambuca Beaches, Ubatuba on the Northern Coast of São Paulo State, Brazil, as Related to Meteorological Conditions.** Journal of Coastal Research, SI 35, 184-193.

BARTRAM, J., REES, G., 2000. **Monitoring Bathing Waters.** London: E & FN Spon.

BRAGA, E. S.; BONETTI, C. V. D. H.; BURONE, L.; BONETTI J.. 2000. **Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista estuarine system - Brazil.** Marine Pollution Bulletin 40, 165-173.

BEHRENDT, U., AUGUSTIN, J., SPRÖER, C., GELBRECHT, J., SCHUMANN, P., ULRICH, A., 2015. **Taxonomic characterisation of Proteus terrae sp. nov., a N2O-producing, nitrate-ammonifying soil bacterium.** Antonie van Leeuwenhoek 108, 1457-1468.

BERGE, O.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W.; RICHARD, C. et al., 1991. ***Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize.** Canadian Journal of Microbiology, 37(3), 195-203.

BESSER, R. E.; LETT, S. M.; WEBER, J. T.; DOYLE, M. P. et al., 1993. **An Outbreak of Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh-Pressed Apple Cider.** JAMA, 269(17), 2217-2220.

BORENSHTEIN, D., SCHAUER, D. B., 2006. **The genus Citrobacter**. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) The prokaryotes: proteobacteria: gamma subclass, vol 6. Springer, New York, pp 90–98

BrCAST, 2019. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos.** Valid from 2019-02-06. http://brcast.org.br/documentos/ [Acessed 10 February 2019]. Based on: EUCAST, 2019. Breakingpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, valid from 2019-01-01.

BRANDT, C.; BRAUN, S. D.; STEIN, C.; SLICKERS, P. et al., 2017. **In silico serine β-lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species.** Scientific Reports, 7(1), 43232.

BRADY C, DENMAN S, KIRK S, VENTER S, RODRÍGUEZ-PALENZUELA P, COUTINHO T., 2010. **Description of *Gibbsiella quercinecans* gen. nov., sp. nov., associated with acute oak decline.** Syst Appl Microbiol 33, 444–450.

BRENNER DJ, DAVIS BR, STEIGERWALT AG, RIDDLE CF, MCWHORTER AC, ALLEN SD, FARMER JJ 3RD, SAITOH Y, FANNING GR., 1982a. **Atypical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimens and description of *Escherichia hermannii* sp. nov**. J Clin Microbiol 15:703–713

BRENNER DJ, MCWHORTER AC, KNUTSON JK, STEIGERWALT AG., 1982b. ***Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds.** J Clin Microbiol 15:1133–1140

BRENNER, D.J., O'HARA, C.M., GRIMONT, P.A., JANDA, J. M., FALSEN, E., ALDOVA, E., AGERON, E., SCHINDLER, J., ABBOTT, S. L., STEIGERWALT, A. G., 1999. **Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillenii* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 10) and *Citrobacter murliniae* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 11).** J Clin Microbiol 37, 2619–2624.

BRUN-BUISSON, C.; PHILIPPON, A.; ANSQUER, M.; LEGRAND, P. et al., 1987 **Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*.** The Lancet. 330(8554). 302-306.

BURGESS N, MCDERMOTT S, WHITING J., 1973. **Aerobic bacteria occurring in the hind-gut of the cockroach, *Blatta orientalis***. J Hyg (Lond) 71:1–7

BURUAEM, L. M., CASTRO, I. B., HORTELLANI, M. A., TANIGUCHI, S., FILLMANN, G., SASAKI, S. T., PETTI, M. A. V., SARKIS, J. E. S., BÍCEGO, M. C., MARANHO, L. A., DAVANSO, M. B., NONATO, E. F., CESAR, A., COSTA-LOTUFO, L. V., ABESSA, D. M. S., 2013. **Integrated quality assessment of sediments from harbor áreas in Santos – São Vicente Estuarine System, Southern Brazil.** Estuarine, Coastal and Shelf Science, 130, 179–189.

CABELLI, V. J., 1983. **Health effects criteria for marine recreational waters.** Research Triangule Park, USEPA. EPA-600/1-80-030, 99p.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention, 2013. https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf (Acessado em 05/06/19 às 10:05)

CDC – Centers for Disease Control and Prevention, 2018. https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html (Acessado em 05/06/19 às 09:21)

CDC – Centers for Disease Control and Prevention, 2019. https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html (Acessado em 12/12/19 às 20:33)

CALHEIROS, C. S. C.; PEREIRA, S. I. A.; BRIX, H.; RANGEL, A. O. S. S. et al., 2017. **Assessment of culturable bacterial endophytic communities colonizing *Canna flaccida* inhabiting a wastewater treatment constructed wetland.** Ecological Engineering. 98, 418-426.

CARTER, J. S., BOWDEN, F. J., BASTIAN, I., MYERS, G. M., SRIPRAKASH, K. S., KEMP, D. J., 1999. **Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 49(4), 1695-1700

CASTANHEIRA, M.; DESHPANDE, L. M.; DIPERSIO, J. R.; KANG, J. et al., 2009. **First Descriptions of KPC in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** Journal of Clinical Microbiology, 47(12), 4129.

CASTELLANI, A., CHALMERS, A. J., 1919. **Manual of tropical medicine**, 3rd ed. Williams, Wood and Co., New York

CESAR, A., PEREIRA, C. D. S., ABESSA, D. M. S., FERNÁNDEZ, N., CHOUERI, R. B., 2006. **Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente estuarine system – Brazil.** Braz. J. Oceanogr., 54 (1), 55-63.

CESAR, A., LIA, L. R. B., PEREIRA, C. D. S., SANTOS, A. R., CORTEZ, F. S., CHOUERI, R. B., DE ORTE, M. R., RACHID, B. R. F., 2014. **Environmental assessment of dredged sediment in the major Latin America seaport (Santos, São Paulo – Brazil): An integrated approach.** Science of the Total Environment, 497–498, 679–687.

CETESB. 2001. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, 141p..

CHAN, K.-Y.; WONG, S. H.; MAK, C. Y., 1979. **Effects of bottom sediments on the survival of *Enterobacter aerogenes* in seawater.** Marine Pollution Bulletin, 10(7), 205-210.

CHANDER, Y.; GOYAL, S. M.; GUPTA, S. C., 2006. **Antimicrobial resistance of *Providencia* spp. isolated from animal manure.** The Veterinary Journal, 172(1), 188-191.

CHANG, C. L.; JEONG, J.; SHIN, J. H.; LEE, E. Y. et al., 1999. ***Rahnella aquatilis*** **Sepsis in an Immunocompetent Adult.** Journal of Clinical Microbiology, 37(12), 4161.

CHEN, D., JI, Y., 2018. **New insights into *Citrobacter freudii* sepsis in neonates.** Pediatrics International. doi:10.1111/ped.13715

CHOWDHRY, S. A., COHEN, A. R., 2012. ***Citrobacter*** **brain abscesses in neonates: early surgical intervention and review of the literature**. Childs Nerv Syst 28, 1715–1722

CHUN, S.; YUN, J. W.; HUH, H. J.; LEE, N. Y., 2014. **Low virulence? Clinical characteristics of *Raoultella planticola* bacteremia.** Infection, 42(5), 899-904.

CHUN, S.; YUN, J. W.; HUH, H. J.; LEE, N. Y. 2015. **Clinical characteristics of *Raoultella ornithinolytica* bacteremia.** Infection, 43(1), 59-64.

CLERMONT, D., MOTREFF, L., PASSET, V., FERNANDEZ, J., BIZET, C., BRISSE, S., 2015. **Multilocus sequence analysis of the genus *Citrobacter* and description of *Citrobacter pasteurii* sp. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65, 1486–1490

CLSI, 2019. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 29th ed. CLSI standard M100.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CORBISIER, T. N., 1991. **Benthic macrofaunal of sandy intertidal zone at Santos estuarine system, São Paulo, Brazil**. Bolm Inst. oceanogr., S Paulo, 38(1), 1-13.

COSTA M.A.A., OWEN R.A., TAMMSALU T., et al., 2019. **Controlling and co-ordinating chitinase secretion in a *Serratia marcescens* population.** Microbiology (Reading, England), 165(11), 1233-1244.

COUTINHO, T. A., VENTER, S. N., 2009. ***Pantoea ananatis*****: an unconventional plant pathogen.** Molecular Plant Pathology, 10 (3), 325 – 335.

CRUZ, A. T., CAZACU, A. C., ALLEN, C. H., 2007. ***Pantoea agglomerans*****, a Plant Pathogen Causing Human Disease.** Journal of Clinical Microbiology, 45 (6), 1989 – 1992.

DAI, H., WANG, Y. FANG, Y., HUANG, Z., KAN, B., WANG, D., 2018a. ***Proteus alimentorum*** **sp. nov., isolated from pork and lobster in Ma'anshan city, China.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 68, 1390-1395.

DAI, H., WANG, Y., FANG, Y., XIAO, T., HUANG, Z., KAN, B., WANG, D., 2018b. ***Proteus columbae*** **sp. nov., isolated from a pigeon in Ma'anshan, China.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 68, 552-557.

DALFIOR, J. S., 2005. **Avaliação da eficiência do grupo coliforme fecal como indicador de balneabilidade de praias quando comparado com Enterococos: estudo**

de caso da praia da Curva da Jurema (Vitória, ES). Monografia de Graduação em Oceanografia - UFES, Vitórias (ES).

DAME, R. F., 1996. **Organism level processes.** In: DAME, R. F., Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach. New York: CRC, p. 35 -74.

DASHTI, A. A.; JADAON, M. M.; ABDULSAMAD, A. M.; DASHTI, H. M., 2009. **Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques.** Kuwait Medical Journal, 41 (2), 117–122.

DAUGA C, BREEUWER P., 2008. **Taxonomy and Physiology of *Enterobacter sakazakii***, p 1-26. *In* Farber J, Forsythe S, Doyle M (ed), *Enterobacter sakazakii*. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555815608.ch1

DAVIES, C. M., BAVOR, H. J., 2000. **The fate of storm water associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems.** Journal of Applied Microbiology, 89 (2), 349–460.

DAVIES, C. M., LONG, J. A. H., DONALD, M., ASHBOLT, N. J., 1995. **Survival of fecal microorganism in marine and fresh-water sediments.** Applied Environmental Microbiology, 61 (5), 1888–1896.

DAVIES-COLLEY, R. J., DONNISON, A. M., SPEED, D. J., ROSS, C. M., NAGELS, J. W., 1999. **Inactivation of fecal indicator microorganisms in waste stabilization ponds: Interactions of environmental factors with sunlight.** Water Research, 33 (5), 1220–1230.

DAVIN-REGLI. A., LAVIGNE, J. P., PAGÈS, J. M., 2019. ***Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emergin Antimicrobial Resistance.** Clinical Microbiology, 32 (4), 1–32.

DE BAERE, T., VERHELST, R., LABIT, C., VERSCHRAEGEN, G., WAUTERS, G., CLAEYS, G., VANEECHOUTTE, M., 2004. **Bacteremic infection with *Pantoea ananatis*.** Journal of Clinical Microbiology, 42 (9), 4393 – 4395.

DEMIRAY, T.; KOROGLU, M.; ÖZBEK, A.; HAFIZOĞLU, T. et al., 2015. **The first case of *Raoultella terrigena* infection in an infant.** The Turkish journal of pediatrics, 58, 17-21.

DIXON, M.; FLINT, S.; PALMER, J.; LOVE, R. et al., 2018. **Analysis of culturable and non-culturable bacteria and their potential to form biofilms in a primary treated dairy wastewater system.** Environmental Technology, 39(17), 2185-2192.

DOIJAD, S., IMIRZALIOGLU, C., YAO, Y., PATI, N. B., FALGENHAUER, L., HAIN, T., FOESEL, B. U., ABT, B., OVERMANN, J., MIRAMBO, M. M., MSHANA, S. E., CHAKRABORTY, T., 2016. ***Enterobacter bugandensis* sp. nov., isolated from neonatal blood.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66, 968–974

DRANCOURT, M., BOLLET, C., CARTA, A., ROUSSELIER, P., 2001**. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate Klebsiellaand Raoultellagen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov.** Int J Syst Evol Microbiol 51, 925–932.

DRELICHMAN, V., BAND, J. D., 1985. **Bacteremias due to *Citrobacter diversus* and *Citrobacter robacter freudii*.** Arch Intern Med, 145, 1808–1810.

DUBOUIX, A.; ROQUES, C.; SEGONDS, C.; JEANNOT, M. J. et al., 2005. **Epidemiological investigation of a *Serratia liquefaciens* outbreak in a neurosurgery department.** Journal of Hospital Infection, 60(1), 8-13.

EL-HENDAWY, H. H.; OSMAN, M. E.; SOROUR, N. M., 2005. **Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*.** Microbiological Research, 160(4), 343-352.

EKWANZALA, M. D., DEWAR, J. B., KAMIKA, I., MOMBA, M. N. B., 2020. **Genome sequence of carbapenem-resistant *Citrobacter koseri* carrying *bla*$_{\text{OXA-181}}$ isolated from sewage sludge.** Jornal of Global Antimicrobial Resistance, 20, 94–97.

EWING, W. H.; DAVIS, B. R., 1972. **Biochemical Characterization of *Citrobacter diversus* (Burkey) Werkman and Gillen and Designation of the Neotype Strain.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 22(1), 12.

FAGUNDES, L., TOMÁS, A. R. G., CASARINI, L. M., BUENO, E. F., LOPES, G. M., MACHADO, D. A. L., ROSA, R. A., BRAGA, A. C. A., CAMARGO, F. B. F., OBERG, I. M. F., PELLEGRINI, S. O. P., 2007. **A pesca de arrasto-de-praia na ilha de São Vicente, São Paulo, Brasil.** Série Relatórios Técnicos, São Paulo, 29, 1–43.

FARINNACCIO, A., GOYA, S. C., TESSLER, M. G., 2009. **Variações da linha de costa nas baías de Santos e São Vicente.** Quaternary and Environmental Geosciences, 01, 42-48.

FARMER JJ 3rd, DAVIS BR, HICKMAN-BRENNER FW, McWHORTER A, HUNTLEY-CARTER GP, ASBURY MA, RIDDLE C, WATHEN-GRADY HG, ELIAS C, FANNING GR et al., 1985. **Biochemical identification of new species and biogroups ofEnterobacteriaceae isolated from clinical specimens**. J Clin Microbiol 21:46–76

FAZAL, M.-A.; ALEXANDER, S.; GRAYSON, N. E.; DEHEER-GRAHAM, A. et al., 2019. **Complete Whole-Genome Sequences of Two *Raoultella terrigena*, NCTC 13097 and NCTC 13098, Isolated from Human Cases.** Microbiology Resource Announcements, 8(27), 219-239.

FIELD, K. G., SAMADPOUR, M., 2007. **Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality.** Water Research, 41, 3517 - 3528.

FIGUEIRA, V.; SERRA, E.; MANAIA, C. M., 2011. **Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters.** Science of The Total Environment, 409(6), 1017-1023.

FOPPEN, J. W. A.; SCHIJVEN, J. F., 2006. **Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions.** Water Research, 40(3), 401-426.

FRANCINO, M. P., SANTOS, S. R., OCHMAN, H., 2006. **Phylogenetic relationships ofbacteria with special reference to endosymbionts and enteric species.** In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) The prokaryotes: proteobacteria: gamma subclass, vol 6. Springer, New York

FRAZZON, A. 2017. **Antibiotic-resistant bacteria in free-living marine species.** Veterinary Records, 179, 648-649.

FRESIA, P.; ANTELO, V.; SALAZAR, C.; GIMÉNEZ, M. et al., 2019. **Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters.** Microbiome, 7(1), 35.

GAASTRA, W.; KUSTERS, J.; DUIJKEREN, E.; LIPMAN, L. J. A., 2014. ***Escherichia fergusonii.*** Veterinary microbiology, 172(1-2), 7-12.

GAJDÁCS, M., 2019. **Epidemiology and antibiotic resistance trends of *Pantoea* species in a tertiary-care teaching hospital: A 12-year retrospective study.** Developments in Health Science, 2 (3), 72 – 75.

GALLER, H.; FEIERL, G.; PETTERNEL, C.; REINTHALER, F. F. et al., 2017. **Multiresistant Bacteria Isolated from Activated Sludge in Austria.** International journal of environmental research and public health, 15(3), 479.

GHAFUR, A.; SHANKAR, C.; GNANASOUNDARI, P.; VENKATESAN, M. et al., 2019. **Detection of chromosomal and plasmid-mediated mechanisms of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Indian food samples.** Journal of Global Antimicrobial Resistance, 16, 48-52.

GIANESELLA, S. M. F., RICCI, F. P., MOSER, G. A. O., SALDANHA-CORRÊA, F. M. P, TOMAS, A. E. F.. 2006. **Distribuição do material em suspensão nos canais de Santos e São Vicente.** In: Environmental and Health World Congress: 642-645.

GRILLO, V., PARSONS, E. C. M., SHRIMPTON, J. H., 2001. **A review of sewage pollution and cetaceans: a Scottish perspective.** Paper presented to the Scientific Committee at the 53rd Meeting of the International Whaling Commission, 3 - 16July 2001, London (UK).

GROHSKOPF, L.; ROTH, V.; FEIKIN, D.; ARDUINO, M. et al., 2001. ***Serratia liquefaciens* Bloodstream Infections from Contamination of Epoetin Alfa at a Hemodialysis Center.** The New England journal of medicine, 344, 1491-1497.

GROSS, R. J., ROWE, B., EASTON, J. A., 1973. **Neonatal meningitis caused by *Citrobacter koseri*.** J Clin Path, 26, 138–139.

GROSS, R. J., ROWE, B., 1983. ***Citrobacter koseri* (syn. *C. diversus*): biotype, serogroup and drug resistance patterns of 517 strains.** Epidemiology & Infection, 90 (2), 233–239.

GU, Y., WANG, H., GUO, C., CHEN, J., CAO, H., 2019. ***Citrobacter freudii*: a causative agente for ulcer disease in snakehead fish *Ophiocephalus argus* (Cantor).** Israeli Journal of Aquaculture, 71, 8 p.

HACHICH, E. M.; DI BARI, M.; CHRIST, A. P. G.; LAMPARELLI, C. C. et al., 2012. **Comparison of thermotolerant coliforms and Escherichia coli densities in freshwater bodies.** Brazilian Journal of Microbiology, 43, 675-681.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D., 2001**. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis.** Palaeontologia Electronica 4 (1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

HAMILTON, A. L.; KAMM, M. A.; NG, S. C.; MORRISON, M., 2018 ***Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens.** Clinical Microbiology Reviews, 31(3), 17-85.

HANCOCK, L. E., GILMORE, M. S., 2006. **Pathogenicity of *enterococci***. In: Fischetti, VA, Novick, RP, Ferretti, JJ, Portnoy, DA, Rood, JI (Eds). Gram-positive Pathogens, second ed. ASM Press, Washington, DC, pp 299–311.

HARARI, J., CAMARGO, R., 1998. **Modelagem numérica da região costeira de Santos (SP): Circulação de mare.** Revista Brasileira de Oceanografia, 46 (2), 135- 156.

HARDOIM, P. R., NAZIR, R., SESSITSCH, A., ELHOTTOVA, D., KORENBLUM, E., VAN OVERBEEK, L. S., VAN ELSAS, J. D., 2013). **The new species *Enterobacter oryziphilus* sp. nov. and *Enterobacter oryzendophyticus* sp. nov. are key inhabitants of the endosphere of rice.** BMC Microbiol 13, 164.

HARNETT, S. J.; ALLEN, K. D.; MACMILLAN, R. R., 2001. **Critical care unit outbreak of *Serratia liquefaciens* from contaminated pressure monitoring equipment.** Journal of Hospital Infection, 47(4), 301-307.

HASAN, S., SULTANA, M., HOSSAIN, M. A., 2019. **Complete genome arrangement revealed the emergence of a poutry origin superbug *Citrobacter portucalensis* strain NR-12.** Journal of Global Antimicrobial Resistance, 18, 126–129.

HAUSER, G., 1885. **Über Fäulnissbakterien und deren Beziehungen zur Septicämie. Ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze.** Vogel, Leipzig.

HEJAZI, A. & FALKINER, F., 1997. ***Serratia marcescens***. Journal of medical microbiology, 46, 903-912.

HENRIOT, C. P.; MARTAK, D.; CUENOT, Q.; LOUP, C. et al., 2019. **Occurrence and ecological determinants of the contamination of floodplain wetlands with *Klebsiella pneumoniae* and pathogenic or antibiotic-resistant *Escherichia coli*.** FEMS Microbiology Ecology, 95(8), 1-12.

HICKMAN, F. W., STEIGERWALT, A. G., FARMER III, J. J., BRENNER, D. J., 1983 **Identification of *Proteus penneri* sp. nov., formerly known as *Proteus vulgaris* indole negative or as *Proteus vulgaris* biogroup 1.** J. Clin. Microbiol., 15, 1097-1102.

HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K., KRATZ, K. L., 1999. **Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.** The Science of the Total Environment, 225, 109 - 118.

HLADICZ, A.; KITTINGER, C.; ZARFEL, G., 2017. **Tigecycline Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Austrian River Water.** International Journal of Environmental Research and Public Health, 14(10).

HOFFMANN H, STINDL S, LUDWIG W, STUMPFA, MEHLEN A, HEESEMANN J, MONGET D, SCHLEIFER KH, ROGGENKAMP A, 2005a. **Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies dissolvens comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei***. Syst Appl Microbiol 28:196–205.

HOFFMANN H, STINDL S, LUDWIG W, STUMPF A, MEHLEN A, MONGET D, PIERARD D, ZIESING S, HEESEMANN J, ROGGENKAMP A, SCHLEIFER KH., 2005b. ***Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance.** J Clin Microbiol 43:3297–3303

HOFFMANN H, STINDL S, STUMPF A, MEHLEN A, MONGET D, HEESEMANN J, SCHLEIFER KH, ROGGENKAMP A., 2005c. **Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance.** Syst Appl Microbiol 28:206–212

HOLA, V.; PEROUTKOVA, T.; RUZICKA, F., 2012. **Virulence factors in *Proteus* bacteria from biofilm communities of catheter-associated urinary tract infections.** FEMS Immunology & Medical Microbiology, 65(2), 343-349.

HOOD, T., VAUGHN, M., 2019. **M453 *Pantoea agglomerans*: an atypical pathogen in chronic sinusitis.** Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 123 (5), S137.

HORMAECHE, E., Wards PR., 1960. **A proposed genus Enterobacter.** Int Bull Bacteriol Nomenc Taxon 10:71–74

HYUN, D. W., JUNG, M. J., KIM, M. S., SHIN, N. R., KIM, P. S., WHON, T. W., BAE, J. W., 2016. ***Proteus cibarius* sp. nov., a swarming bacterium from Jeotgal, a traditional Korean fermented seafood, and emended description of the genus Proteus.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 66, 2158-2164.

HUYS G, CNOCKAERT M, JANDA JM, SWINGS J., 2003. ***Escherichia albertii*** **sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children**. Int J Syst Evol Microbiol 53:807–810

IBAMA, 1993. **Catálogo das artes de pesca artesanal do Estado de Santa Catarina.** 1ª ed. V 1. 120p.

IBGE, Censo Demográfico. 2010. Primeiros Resultados do Censo 2010, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE.

IGBINOSA, E. O., RATHJE, J., HABERMANN, D., BRINKS, E., CHO, G., FRANZ, C. M. A. P., 2018. **Draft genome sequence of multidrug-resistant strain *Citrobacter portucalensis* MBTC-1222, isolated from Uziza (*Piper guineese*) leaves in Nigeria.** Microbiol Res Ann, 6 (9), 1–2.

IMHOFF, J. F., 2005. "*Enterobacteriales*". In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R., et al (Ed.). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. Boston, MA: Springer US. 587-850.

INGHAM, A. C., REYES, J. C. N., LANG, M. M., 2000. **Potential use of presuntive enterococci and staphylococci as indicators os sanitary conditions inplant making hard Italian-type cheese.** Journal of Food Protection. 63 (12), 1697-1701.

ISHII, S.; HANSEN, D. L.; HICKS, R. E.; SADOWSKY, M. J., 2007. **Beach Sand and Sediments are Temporal Sinks and Sources of *Escherichia coli* in Lake Superior.** Environmental Science & Technology, 41(7), 2203-2209.

ISLAM, S., TANAKA, M., 2004. **Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis.** Marine Pollution Bulletin 48, 624 – 649.

ITALINI, D. M., 2014. **Resposta morfodinâmica à alimentação artificial da Ponta da Praia, Santos, SP.** Dissertação de mestrado (Ciências, Área Oceanografia Geológica), Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo (USP).

IVERSEN, C., LEHNER, A., MULLANE, N. *et al.,* 2007. **The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1**. *BMC Evol Biol* **7,** 64.

IZARD, D., GAVINI, F., TRINEL, P. A, LECLERC, H., 1981. **Deoxyribonucleic Acid Relatedness Between *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter amnigenus* sp. nov.** International Journal of Systematic Bacteriology, p. 35-42

JACKSON, T. J.; WANG, H.; NUGENT, M. J.; GRIFFIN, C. T. et al., 1995. **Isolation of insect pathogenic bacteria, *Providencia rettgeri*, from *Heterorhabditis* spp.** Journal of Applied Bacteriology, 78(3), 237-244.

KAHVENCI, A., ASICIOGLU, E., TIGEN, E., ARI, E., ARIKAN, H., ODABASI, Z., OZENER, C., 2011. **Unusual causes of peritonitis in a peritoneal dialysis patient: *Alcaligenes faecalis* and *Pantoea agglomerans*.** Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 10:12.

KAMPFER P, RUPPEL S, REMUS R., 2005**. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*.** Syst Appl Microbiol 28:213–221

KANKI, M.; YODA, T.; TSUKAMOTO, T.; SHIBATA, T., 2002. ***Klebsiella pneumoniae* Produces No Histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* Strains Are Histamine Producers.** Applied and Environmental Microbiology, 68(7), 3462.

KELLER, R.; PRATTE-SANTOS, R.; SCARPATI, K.; MARTINS, S. A. et al., 2019. **Surveillance of Enteric Viruses and Thermotolerant Coliforms in Surface Water and Bivalves from a Mangrove Estuary in Southeastern Brazil.** Food and Environmental Virology, 11(3), 288-296.

KERRY, E., 1990. **Microorganisms colonizing plants and soil subjected to different degrees of human activity, including petroleum contamination, in the Vestfold hills and MacRobertson Land, Antarctica.** Polar Biology, 10(6), 423-430.

KHUNTHONGPAN, S.; SUMPAVAPOL, P.; TANASUPAWAT, S., 2013. ***Providencia thailandensis* sp. nov., isolated from seafood processing wastewater.** The Journal of General and Applied Microbiology, 59(3), 185-190.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; KRISHNAN, H. B., 1997. ***Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite.** FEMS Microbiology Letters, 153(2), 273-277.

KO, W. C., PATERSON, D. L., SAGNIMENI, A., HANSEN, D. S., VON GOTTBERG, A., MOHAPATRA, S., CASELLAS, J. M., GOOSSENS, H., MULAZIMOGLU, L., TRENHOLME, G., KLUGMAN, K. P., MCCORMACK, J. G., YU, V. L., 2002. **Community-acquired *Klebisiella pneumoniae* bacteremia: Global differences in clinical patterns.** Emerg Infect Dis, 8 (2), 160 -166.

KRATZ, A., GREENBERG, D., BARKI, Y., COHEN, E., LIFSHITZ, M., 2003. ***Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review.** International Child Health, 88 (6), http://dx.doi.org/10.1136/adc.88.6.542

KUEH, C. S. W.; KUTARSKI, P.; BRUNTON, M., 1992. **Contaminated marine wounds—the risk of acquiring acute bacterial infection from marine recreational beaches.** Journal of Applied Bacteriology. 73 (5). 412-420.

LAGIER, J., KARKOURI, K.E., MISHRA, A.K. *et al.,* 2013. **Non contiguous-finished genome sequence and description of *Enterobacter massiliensis* sp. nov.** *Stand in Genomic Sci* **7,** 399–412.

LALAOUI, R., DJUKOVIC, A., BAKOUR, S., HADJADJ, L., SANZ, J., SALAVERT, M., LÓPEZ-HOTANGAS, J. L., SANZ, M. A., UBEDA, C., ROLAIN, J. M., 2019. **Genomic characterization of *Citrobacter freudii* strains coproduciong OXA-48 and VIM-1 carbapenemase enzymes in leukemic patient in Spain.** Ant Res & Inf Cont, 8:167.

LAMPARELLI, M. C., COSTA, M. P., PRÓSPERI, V. A., BEVILACQUA, J. E., ARAÚJO, R. P. A., EYSINK, G. G. J., POMPEIA, S., 2001. **Sistema estuarino de Santos e São Vicente.** São Paulo: Relatório Técnico CETESB. 183pp.

LECLERC, H. (1962). **Etude biochimique d'enterobacteriaceae pigmentees.** Ann Inst Pasteur (Paris) 102, 726–741.

LEE, D., GODFREY, R., HYDE, J., JAMES, R., 2020. **An ascending aortic mass infected with *Citrobacter koseri* in a young woman.** Clin Med (Lond), 20 (1), 92–94.

LEE, H.-W.; KANG, H.-Y.; SHIN, K.-S.; KIM, J., 2007. **Multidrug-resistant Providencia isolates carrying *bla*$_{\text{PER-1}}$, *bla*$_{\text{VIM-2}}$, and armA.** Journal of microbiology (Seoul, Korea), 45(3), 272-274.

LEMARCHAND, K., LEBARON, P., 2003. **Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators.** FEMS Microbiology Letters 218, 203-209.

LIM, P. S., CHEN, S. L., TSAI, C. Y., PAI, M. A., 2006. ***Pantoea* peritonitis in a patient receiving chronic ambulatory peritoneal dialysis (Case Report).** Nephrology, 11 (2), 97 – 99.

LIMA, C. A., 2003. **Estudo de indicadores biológicos de poluição (coliformes totais e coliformes fecais) e de suas relações com os teores de nitrogênio amoniacal, uréia e oxigênio dissolvidos, no Sistema Estuarino de Santos/São Vicen te e Baía de Santos.** Master Degree. Universidade de São Paulo. Instituto Oceanográfico, S Paulo.

LIU, S., JIN, D., LAN, R., WANG, Y., MENG, Q., DAI, H., LU, S., HU, S., XU, J., 2015. ***Escherichia marmotae* sp. nov., isolated from faeces of *Marmota himalayana*.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65(7), 2130-2134.

LOTTE, L., SINDT, A., RUIMY, R., NERI, D., LOTTE, R., WEISS, N., VASSALLO, M., 2019. **Description of the first case of catheter-related bloodstream infection due to *Pantoea eucrina* in a cancer patient.** SN Comprehensive Clinical Medicine, 1, 142 - 145.

LOURENÇO, N. G. G. S.; TAKAHASHI, C. K.; LOPES, T. F.; LOPES, C. A. M. 2007. **Environmental parameters and antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae***

isolated from estuarine waters of São Vicente, São Paulo state, Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 13. 472-478.

LUO, J.; YAO, X.; LV, L.; DOI, Y. et al. 2017. **Emergence of *Raoultella ornithinolytica* and *Escherichia coli* Isolates from Retail Vegetables in China.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 61(10). 1117-1139.

MADEC, J. Y.; HAENNI, M.; NORDMANN, P.; POIREL, L. 2017**. Extended-spectrum β-lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans?** Clinical Microbiology and Infection. 23(11). 826-833.

MADHAIYAN, M., POONGUZHALI, S., LEE, J. S., SARAVANAN, V. S., LEE, K. C., SANTHANAKRISHNAN P., 2010. ***Enterobacter arachidis* sp. nov., a plant-growth-promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut**. Int J Syst Evol Microbiol 60:1559–1564

MAHROUKI, S.; CHIHI, H.; BOUROUIS, A.; AYARI, K. et al. 2015. **Nosocomial dissemination of plasmids carrying *bla*$_{\text{TEM-24}}$, *bla*$_{\text{DHA}}$-1, aac(6′)-Ib-cr, and qnrA6 in *Providencia* spp. strains isolated from a Tunisian hospital.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 81(1). 50-52.

MAL, P. B.; SARFARAZ, S.; HEREKAR, F.; AMBREEN, R. 2019. **Clinical manifestation and outcomes of multi-drug resistant (MDR) *Raoultella terrigena* infection – A case series at Indus Health Network, Karachi, Pakistan.** IDCases. 18. 628.

MANSOOR, M.; NAEEM, S.; NAIM, A. 2019. **Frequency and antibiotic sensitivity of gram-negative bacteria isolated from raw fish sold in Karachi, Pakistan.** Pure and Applied Biology (PAB). 8(2). 1631-1640.

MANTER DK, HUNTER WJ, VIVANCO JM., 2011**. *Enterobacter soli* sp. nov.: a lignin-degrading -proteobacteria isolated from soil**. Curr Microbiol 62:1044–1049

MAU, N.; ROSS, L. A. 2010. ***Raoultella ornithinolytica* bacteremia in an infant with visceral heterotaxy.** The Pediatric Infectious Disease Journal. 29(5). 477-478.

MBUTHIA, P.; WARUIRU, R.; MWADIME, J.; BEBORA, L. et al. 2019. **Bacterial pathogens isolated from farmed fish and source pond water in Kirinyaga County, Kenya.** International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 7(2). 295-301.

MCLELLAN, S. L. 2004. Genetic **Diversity of *Escherichia coli* Isolated from Urban Rivers and Beach Water.** Applied and Environmental Microbiology. 70(8). 4658.
MEAD, P. S.; GRIFFIN, P. M. 1998. Escherichia coli O157:H7. The Lancet. 352 (9135). 1207-1212.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; HAHNKE, R. L.; PETERSEN, J.; SCHEUNER, C. et al. 2014. **Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy.** Standards in Genomic Sciences. 9(1). 2.

MENDES, B., NASCIMENTO, M. J., OLIVEIRA, J. S., 1993. **Preliminary characterization and proposal of microbiological quality standard of sand beaches.** Water Science and Technology, 27, 453–456.

MERUVU, H., DONTHIREDDY, S. R. R., 2013. **Biochemical and molecular taxonomy of chitinolytic *Citrobacter freudii* str. nov. HARITD11 isolated from Indian marine environment.** Int J Pharma and Bio Sciences, 4(2), B1168–B1175.

MIGNANI, L., BARBIERI, E., MARQUES, H. L. A., OLIVEIRA, A. J. F. C., 2013. **Coliform density in oyster culture waters and its relationship with environmental factors.** Pesq. agropec. bras., 48 (8), 833 - 840.

MORALES-LÓPEZ, S., YEPES, J. A., PRADA-HERRERA, J. C., TORRES-JIMÉNEZ, A., 2019. **Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes.** J. Infect Dev Ctries, 13(4), 265-273.

MOSER, G. A. O., 2002. **Aspectos da eutrofização no Sistema Estuarino de São Vicente-Santos: distribuição espaço temporal da biomassa e produtividade primária fitoplânctonica e transporte instantâneo de sal, clorofila-a, material em suspensão e nutrientes.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. Sã o Paulo, SP. 426p.

MUDRYK, J. Z., 2005. **Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach.** Marine Pollution Bulletin, 50 (1), 80–86.

MUNIZ, P., SILVA, D. A. M., BÍCEGO, M. C., BROMBERG, S., PIRES-VANIN, A. M. S., 2015. **Sewage contamination in a tropical coastal area (São Sebastião Channel, SP, Brazil).** Marine Pollution Bulletin 99, 292 – 300.

MUNOZ-PRICE, L. S.; POIREL, L.; BONOMO, R. A.; SCHWABER, M. J. et al. 2013. **Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases**. The Lancet Infectious Diseases. 13(9). 785-796.

NAKASONE, E. S.; KANESHIRO, R.; MIN, K.; TOKESHI, J. 2015. **Emergence of *Raoultella ornithinolytica* on O'ahu: a case of community-acquired R. ornithinolytica urinary tract infection.** Hawai'i journal of medicine & public health: a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health. 74(5). 174-175.

NAZAROWEC, M., FARBER, J. M., 1997. ***Enterobacter sakazakii*: a review**. International Journal of Food Microbiology, 34(2), 103-113.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. 2009. **The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria.** The Lancet Infectious Diseases. 9(4). 228-236.

OCCHIPINTI, A. G., 1972. **Estudos para o sistema de disposição oceânica dos esgotos de Santos e São Vicente.** Revista DAE 86, 155–176.

O'HARA, C. M., BRENNER, F. W., STEIGERWALT, A. G., HILL, B.C., HOLMES, B., GRIMONT, P. A. D., HAWKEY, P.M., PENNER, J. L., MILLER, J. M., BRENNER, D. J., 2000. **Classification of *Proteus vulgaris* biogroup 3 with recognition of *Proteus hauseri* sp. nov., nom. rev. and unnamed *Proteus genomospecies* 4, 5 and 6.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 1869-1875.

OKWUNDU, N., MERCER, J., 2019.***Pantoea agglomerans* cutaneous infection.** Journal of Dermatology and Dermatologic Surgery, 23, 41 -43.

OLIVEIRA, A. J. F. C., PINHATA, J. M. W., 2008. **Antimicrobial resistence and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil.** Water Research, 42, 2242-2250.

OLIVEIRA, A. F. C., FRANÇA, P. T. R., PINTO, A. B., 2009. **Antimicrobial resistance of heterotrophic marine bacteria isolated from seawater and sands of recreational beaches with different organic pollution levels in southeastern Brazil: evidences of resistance dissemination.** Environ Monit Assess, 169, 375-384.

OLIVEIRA, R. C., 2009. **Ambiente costeiro fragilidades e impactos relacionados a ação antrópica: o cenário da Baixada Santista no Estado de São Paulo/Brasil.** In: 12º Encuentro de Geógrafos de América Latina – Caminando en una América Latina en Transformación.

OLIVERI, P. G., 1982. **Bacterial indicators of pollution.** In: Pipes, W.O. (Ed.), Bacterial Indicators of Pollution. CRC Press, Boca Raton (FL), 21–41.

OLSON, D. S.; ASARE, K.; LYONS, M.; HOFINGER, D. M. 2013. **A novel case of *Raoultella planticola* urinary tract infection**. Infection. 41(1). 259-261.

ORDENTLICH A., ELAD Y., CHET I. 1988 **The role of chitinase of *Serratia marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium rolfsii*.** Phytopathology. 78(1). 84-88.

OSTROWSKY B.E., WHITENER C., BREDENBERG H.K., CARSON L.A., HOLT S., HUTWAGNER L., ARDUINO M.J., JARVIS W.R., 2002. ***Serratia marcescens* bacteremia traced to an infused narcotic.** N Engl J Med. 346(20). 1529-1537

PARK, J. S.; HONG, K. H.; LEE, H. J.; CHOI, S. H. et al. 2011. **Evaluation of three phenotypic identification systems for clinical isolates of *Raoultella ornithinolytica*.** Journal of Medical Microbiology. 60(4). 492-499.

PAPADAKIS, J.A., MAVRIDOU, A., RICHARDSON, S.C., LAMPIRI, M., MARCELOU, U., 1997. **Bather-related microbial and yeast populations in sand and seawater.** Water Res. 31 (4), 799–8

PARTE, A. C., 2014. **LPSN – list of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Nucleic Acids Res 42, D613–D616.

PATEL, C. B.; SHANKER, R.; GUPTA, V. K.; UPADHYAY, R. S. 2016. **Q-PCR**

Based Culture-Independent Enumeration and Detection of *Enterobacter*: An Emerging Environmental Human Pathogen in Riverine Systems and Potable Water. Frontiers in Microbiology, 7. 172.

PENG G, ZHANGW, LUO H, XIE H, LAIW, TAN Z., 2009. ***Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*.** Int J Syst Evol Microbiol 59:1650–1655.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G.; BURLAND, V.; MAU, B. et al. 2001. **Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.** Nature. 409 (6819). 529-533.

PIANETTI, A., BRUSCOLINI, F., SABATINE, L., COLATONI, P., 2004. **Microbial characteristics of marine sediments in bathing area along Pesaro-Gabicce coast (Italy): a preliminary study.** J. Appl. Microbiol., 97, 682-689.

PULIAN MORAIS, V.; DAPORTA, M. T.; BAO, A. F.; CAMPELLO, M. G. et al. 2009. **Enteric Fever-Like Syndrome Caused by *Raoultella ornithinolytica* (*Klebsiella ornithinolytica*).** Journal of Clinical Microbiology, 47, n. 3, p. 868, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013. R: **A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.

RACHID, B. R. F., 2002. **Avaliação ecotoxicológica dos efluentes domesticos lançados pelos sistemas de disposição oceânica da Baixada Santista.** Tese de Doutorado. São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 286pp.

RAHN O (1937) **New principles for the classification of bacteria**. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infekt Hyg Abt II. 96, 273–286.

RANGEL, J. M.; SPARLING, P. H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P. M. et al. 2005. **Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002.** Emerging infectious diseases. 11(4). 603-609.

RIBEIRO, T. G., CLERMONT, D., BRANQUINHO, R., MACHADO, E., PEIXE, L., BRISSE, S., 2017a. ***Citrobacter europaeus* sp. nov., isolated from water and human faecal samples.** Int J Syst Evol Microbiol, 67 (1), 170–173.

RIBEIRO, T. G., GONÇALVES, B. R., SILVA, M. S., NOVAIS, A., MACHADO, E., CARRIÇO, J. A., PEIXE, L., 2017b. ***Citrobacter portucalensis* sp. nov., isolated from an aquatic sample.** Int J Syst Evol Microbiol, 67 (1), 3513–3517.

RODRÍGUEZ C., BRENGI S., CÁCERES M.A., MOCHI S., VIÑAS M.R., RIZZA C.A., MERLETTI G., BRU E., ASSA J.D., RAYA R.R., CENTRÓN D., 2018. **Successful management with fosfomycin + ceftazidime of an infection caused by multiple highly-related subtypes of multidrug-resistant and extensively drug-resistant KPC-producing Serratia marcescens.** Int J Antimicrob Agents. 52(5), 737-739

ROTH, V., ARDUINO, M., NOBILETTI, J., HOLT, S., CARSON, L., WOLF, C., LENES, B., ALLISON, P., JARVIS, W. 2000. **Transfusion-related sepsis due to *Serratia liquefaciens* in the United States.** Transfusion. 40. 931-935

SAMONIS, G., KARAGEORGOPOULOS, D. E., KOFTERIDIS, D. P., MATTHAIOU, D. K., SIDIROPOULOU, V., MARAKI, S., FALAGAS, M. E., 2009. ***Citrobacter* infections in a general hospital: characteristics and outcomes**. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28, 61–68.

SAMPAIO A. F. P., MATEUS, M., RIBEIRO, R. B., BERZIN, G., 2008. **A Modelling Approach To The Study of Faecal Pollution In the Santos Estuary.** In: R. Neves; J. Baretta; M. Mateus. (Org.) Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America. IST Press, Lisboa, Portugal. P. 425-434.

SAMPAIO, A. F. P., 2010. **Avaliação da correlação entre parâmetros de qualidade da água e socioeconômicos no complexo estuarino de Santos - São Vicente, através de modelagem numérica ambiental.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental, Universidade de São Paulo (USP), 171p.

SAMUEL, B. A., IGBOAMA, M. C., OLUFADE, I. I., 2019. **Impacto f integrated fish farming on antimicrobial resistant bacteria in pond environments in Osun State, Nigeria.** Int J Curr Microbiol App Sci, 8 (9), 2427–2434.

SATO, M. I. Z., BARI, M. D., LAMPARELLI, C. C., TRUZZI, A. C., COELHO, M. C. L. S., HACHICH, E. M., 2005. **Sanitary quality of sands frommarine recreational beaches of São Paulo, Brazil**. Braz.J. Microbiol. 36 (4), 321–326

SAVICHTCHEVA, O., OKABE, S., 2006. **Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives.** Water Research 40, 2463 - 2476.

SANDAL, G.; OZEN, M. 2014. **Fatal *Raoultella ornithinolytica* sepsis and purpura fulminans in a preterm newborn.** Indian Journal of Paediatric Dermatology. 15(1). 24-26.

SCHEUTZ, F. 2015. **Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. In: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing E. coli.** American Society of Microbiology. 553.

SEKOWSKA, A.; MIKUCKA, A.; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. 2018. **Identification of *Raoultella* spp.: Comparison of three methods. Indian Journal of Medical** Microbiology. 36(2). 197-200

SHAIKH, M. M.; MORGAN, M. 2011. **Sepsis caused by *Raoultella terrigena*.** JRSM Short Reports. 2(6). 1-3.

SHARMA, D.; PATEL, A.; SONI, P.; SHASTRI, S. et al. 2017. ***Leminorella*** **sepsis in very low birth weight neonate as cause of neonatal mortality.** The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 30(9). 1057-1059.

SHIMA, A.; HINENOYA, A.; ASAKURA, M.; NAGITA, A. et al. 2012 **Prevalence of *Providencia* Strains among Children with Diarrhea in Japan.** Japanese Journal of Infectious Diseases. 65(6). 545-547.

SIMSEK, M., 2019. **Determination of the antibiotic resistance rates of Serratia *marcescens* isolates obtained from various clinical specimens.** Nigerian journal of clinical practice. 22. 125-130.

SINGH, B. R.; KULSHRESHTHA, S. B. 1992. **Preliminary examinations on the enterotoxigenicity of isolates of *Klebsiella pneumoniae* from seafoods.** International Journal of Food Microbiology. 16(4). 349-352.

SINTON, L. W., DAVIES-COLLEY, R. J., BELL, R. G., 1994. **Inactivation of enrerococci and fecal coliforms from sewage and meat-works effluents I seawater chambers.** Applied Environmental Microbiology, 60 (6), 2040–2048.

SOARES, L. S. H.; ARANTES, L. P. L.; PUCCI, M. C. J., 2018. **Food web of a subtropical tidal flat, Atlantic Southwestern: Temporal and spatial variability of the primary organic sources.** Ocean and Coastal Management, 164, 104-114.

SOLAK, Y.; GUL ENES, E.; ATALAY, H.; GENC, N. et al. 2011. **A rare human infection of *Raoultella ornithinolytica* in a diabetic foot lesion.** Annals of Saudi Medicine. 31(1). 93-94.

STICKLER, D.; GANDERTON, L.; KING, J.; NETTLETON, J. et al. 1993. ***Proteus mirabilis*** **biofilms and the encrustation of urethral catheters.** Urological Research. 21(6). 407-411.

STIEGLITZ, T., TANIGUCHI, M., NEYLON, S., 2008. **Spatial variability of submarine groundwater discharge, Ubatuba, Brazil.** Estuarine, Coastal and Shelf Science 76 (3), 493 – 500.

STOCK, I.; WIEDEMANN, B. 1998. **Natural antibiotic susceptibility of *Providencia stuartii, P. rettgeri, P. alcalifaciens and P. rustigianii strains.*** Journal of Medical Microbiology. 47(7). 629-642.

SUGUIO, K., 1973. **Introdução à Sedimentologia.** Editora Edgard Blucher/EDUSP, São Paulo, 317p.

SUN, F.; YIN, Z.; FENG, J.; QIU, Y. et al. 2015. **Production of plasmid-encoding NDM-1 in clinical *Raoultella ornithinolytica* and *Leclercia adecarboxylata* from China**. Frontiers in Microbiology, 6. 458.

STEPHAN R, VAN TRAPPEN S, CLEENWERCK I, VANCANNEYT M, DE VOS P, LEHNER A., 2007. ***Enterobacter turicensis*** **sp. nov. and** ***Enterobacter helveticus*** **sp. nov., isolated from fruit powder.** Int J Syst Evol Microbiol 57:820–826

STEPHAN R, VAN TRAPPEN S, CLEENWERCK I, IVERSEN C, JOOSTEN H, DE VOS P, LEHNER A., 2008. ***Enterobacter pulveris*** **sp. nov., isolated from fruit powder, infant formula and an infant formula production environment.** Int J Syst Evol Microbiol 58:237–241

SVETLANA, J., DOBRILA, J., LJ, V., 2003. ***Citrobacter freudii*** **as a cause of disease in fish.** Acta Veterinaria (Beograd), 53 (5-6), 399–410.

TANTASUTTIKUL, A.; MAHAKARNCHANAKUL, W. 2019. **Growth parameters and sanitizer resistance of** ***Raoultella ornithinolytica*** **and** ***Raoultella terrigena*** **isolated from seafood processing plant.** Cogent Food & Agriculture. 5(1). 1569830.

TASH, K. 2005. ***Rahnella aquatilis*** **Bacteremia from a Suspected Urinary Source.** Journal of Clinical Microbiology. 43(5). 2526.

TAYLOR, S. L.; GUTHERTZ, L. S.; LEATHERWOOD, M.; LIEBER, E. R. 1979. **Histamine production by** ***Klebsiella pneumoniae*** **and an incident of scombroid fish poisoning. Applied and environmental microbiology.** 37(2). 274-278.

TEIXEIRA, L. M. & MERQUIOR, V. L. C., 2014. **The Prokaryotes**. doi:10.1177/1 464420715581523 al.,t

TINDALL, B. J., SUTTON, G., GARRITY, G. M., 2017. ***Enterobacter aerogenes*** **Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and** ***Klebsiella mobilis*** **Bascomb** ***et al.*** **1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name** ***Klebsiella mobilis*** **Bascomb** ***et al.*** **1971 (Approved Lists 1980).** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67(2), 502-504.

THIOLAS, A.; BOLLET, C.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. et al. 2005**. Successive Emergence of** ***Enterobacter aerogenes*** **Strains Resistant to Imipenem and Colistin in a Patient.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(4). 1354.

TOMINAGA, E. N., RUGNO, N. C., FLYNN, M. N., 2006. **Processos hidrodinâmicos e sedimentares avaliados na região de São Sebastião - SP.** Environmental and Health World Congress, 671 - 675.

TOMMASI, L. R., 1987. **Poluição marinha no Brasil: uma síntese do conhecimento.** Publicação Especial do Instituto Oceanográfico 5, 1-30.

TORANZO, A. E., CUTRÍN, J. M., ROBERSON, B. S., NÚÑEZ, S., ABELL, J. M., HETRICK, F. M., BAYA, A. M., 1994. **Comparsion of the Taxonomy, Serology, Drug Resistance Transfer, and Virulence of** ***Citrobacter freudii*** **Strains from Mammals**

and Poikilothermic Hosts. Applied and Environmental Microbiology, 60 (6), 1789–1797.

TRIVEDI, M. K.; PATIL, S.; SHETTIGAR, H.; GANGWAR, M. et al. 2016. **Biofield Treatment: An Alternative Approach to Combat Multidrug-Resistant Susceptibility Pattern of *Raoultella ornithinolytica*.** Alternative & Integrative Medicine. 4(3).193.

TSENG, S.-P.; WANG, J.-T.; LIANG, C.-Y.; LEE, P.-S. et al. 2014. **First Report of *Raoultella planticola*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 58(1). 593.
TUVENG T.R., HAGEN L.H., MEKASHA S., et al. 2017. **Genomic, proteomic and biochemical analysis of the chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* BJL200.** Biochimica et Biophysica acta. Proteins and Proteomics. 1865(4). 414-421.

UNDERWOOD, S., AVISON, M. B., 2004. ***Citrobacter koseri* and *Citrobacter amalonaticus* isolates carry highly divergent β-lactamase genes despite having high level of biochemical similarity and 16S rRNA sequence homology.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53, 1076–1080.

UROSEVIC, B. (1966), **Canker of poplar caused by *Erwinia cancerogena* n. sp**. (in Czech). Lesnicky Qtsopis, 12, 493-505

VILLAR, C., DE CABRO, L., VAITHIYANATHAN, P., BONETTO, C., 1999. **Pore water N and P concentration in floodplain marsh of Lower Parana River.** Hydrobiologia, 392 (1), 65–71.

VILLARINO M.E., JARVIS W.R., O'HARA C., BRESNAHAN J., CLARK N., 1989. **Epidemic of *Serratia marcescens* bacteremia in a cardiac intensive care unit.** J Clin Microbiol. 27(11). 2433–2436.

WALTERSON, A., M., STAVRINIDES, J., 2015. ***Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae*.**FEMS Microbiology Reviews, 39, 968 – 984.

WANG, J. T.; CHANG, S. C.; CHEN, Y. C.; LUH, K. T. 2000. **Comparison of antimicrobial susceptibility of *Citrobacter freundii* isolates in two different time periods.** Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi. 33(4). 258-262.

WANG, J.-H.; LIU, Y.-C.; LEE, S. S.-J.; YEN, M.-Y. et al. 1998 **Primary Liver Abscess Due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Clinical Infectious** Diseases. 26(6). 1434-1438.

WARREN, J. R., FARMER, J. J., DEWHIRST, F. E., BIRKHEAD, K., ZEMBOWER, T., PETERSON, L. R., SIMS, L., BHATTACHARYA, M., 2000. **Outbreak of Nosocomial Infections Due to Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Strains of Enteric Group 137, a New Member of the Family *Enterobacteriaceae* Closely Related to*Citrobacter farmeri* and *Citrobacter amalonaticus*.** JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, p. 3946–3952

WEI, Z.-Q.; DU, X.-X.; YU, Y.-S.; SHEN, P. et al. 2007. **Plasmid-Mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumonia* Isolate from China.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51(2). 763.

WERKMAN, C. H., GILLEN, G. F., 1932. **Bacteria producing trimethylene glycol**. J Bacteriol 23:167–182

WHALEN, J. G., MULLY, T. W., ENGLISH III, J. C., 2007. **Spontaneous *Citrobacter freudii* infection in an immunocompetent patient.** Arch Dermatol, 143, 124–125.

WHITMAN, R. L., HARWOOD, V. J., EDGE, T. A., NEVERS, M. B., BYAPPANAHALLI, M., VIJAYAVEL, K., BRANDÃO, J., SADOWSKY, M. J., ALM, E. W., CROWE, A., FERGUSON, D., GE, Z., HALLIDAY, E., KINZELMAN, J., KLEINHEINZ, G., PRYBYLA-KELLY, K., STALEY, C., STALEY, Z., SOLO-GABRIELE, H. M., 2014. **Microbes in beach sands: Integrating environment, ecology and public health.** Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 13, 329–368.

WHITMAN, R. L., NEVERS, M. B., 2003. **Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of Lake Michigan beach.** Applied and Environmental Microbiology, 69 (9), 5555–5562.

WHO (World Health Organization), 2011. **Guidelines for Drinking-Water Quality**. WHO,Geneva

WU, W., FENG, Y., ZONG, Z., 2018 **Characterization of a strain representing a new *Enterobacter* species, *Enterobacter chengduesis* sp. nov.** Antonie Van Leeuwenhoek http://doi.org/10.1007/s10482-018-1180-z

WU, G., YANG, J., JIANG, H., DENG, Y., LEAR, G., 2019. **Distribuition of potentially pathogenic bacteria in groundwater of the Jianghan Plain, central China.** International Biodeterioration & Biodegradation, 143:104711.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENECH-SANCHEZ, A. et al. 2001. **Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 45(4). 1151-1161.

YONG, D., LEE, K., YUM, J. H., SHIN, H. B., ROSSOLINI, G. M., CHONG, Y., 2002. **Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-β-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp.** J Clin Microbiol 40, 3798–3801.

YU W.L., LIN C.W., WANG D.Y. 1998 ***Serratia marcescens* bacteremia: clinical features and antimicrobial susceptibilities of the isolates.** Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian yu gan ran za zhi. 31(3). 171-179

YUAN, C., YIN, Z., WANG, J., QIAN, C., WEI, Y., ZHANG, S., JIANG, L., LIU, B., 2019. **Comparative genomic analysis of *Citrobacter* and key genes essential for the**

pathogenicity of *Citrobacter koseri*. Front Microbio, http://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02774

ZAMPIERI, B. D. B.; PINTO, A. B.; SCHULTZ, L.; OLIVEIRA, M. A.; OLIVEIRA, A. J. F. C., 2016. **Diversity and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted Sediments of Araça Bay, São Sebastião (SP), and the Relationship Between Heavy Metals and Organic Matter Concentrations.** Microb Ecol 72, 582-594.

ZHANG, S.; YANG, G.; YE, Q.; WU, Q. et al. 2018. **Phenotypic and Genotypic Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Retail Foods in China.** Frontiers in Microbiology. 9. 289.

ZHU B, LOU MM, XIE GL, WANG GF, ZHOU Q, WANG F, FANG Y, SU T, LI B, DUAN YP., 2011. ***Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L**. Int J Syst Evol Microbiol 61:2769–2774

ANEXO I

PROBAC DO BRASIL

PAINEL PARA ENTEROBACTÉRIAS PROBAC

O Painel para Enterobactérias Probac é um sistema para identificação de enterobactérias que foi desenvolvido visando facilitar a identificação bacteriana de uma das maiores famílias isoladas na microbiologia clínica e industrial.
Com amplo número de provas permite determinar com maior segurança as espécies e subespécies dos isolados, informação que em sendo cada vez mais requerida, principalmente na microbiologia clínica.
O painel é constituído por 24 provas: Indol; Voges Proskauer; citrato de Simmons; produção de H_2S; hidrólise da uréia; triptofano desaminase; descarboxilação de lisina, arginina, ornitina e controle (base Moeller); malonato; hidrólise da esculina; utilização dos açúcares: glicose, lactose, sacarose, manitol, adonitol, mioinositol, sorbitol, rafinose, ramnose, maltose, melobiose; ONPG e a prova adicional de oxidase totalizando 25 provas. A identificação ocorre através das alterações de pH, hidrólise dos substratos e produção de produtos metabólicos. O KIT consiste dos substratos desidratados das provas distribuídos em microplaca.

APRESENTAÇÃO DO PAINEL ENTEROBACTÉRIAS:

A	IND	VP	CIT	H_2S	URE	PDA	CTR	LIS	ARG	ORN	MLN	GLIC
B	LAC	SAC	MAN	ADO	MIO	SOR	RAF	RAM	MAL	MEL	ONPG	ESC

ABREVIAÇÕES/PROVAS/PAINEL:

Painel	Prova	Abreviação
A1	Indol	**IND**
A2	Voges Proskauer	**VP**
A3	Citrato de Simmons	**CIT**
A4	Produção de H_2S	**H_2S**
A5	Hidrólise da uréia	**URÉIA**
A6	Triptofano desaminase	**PDA**
A7	Controle da descarboxilação	**CTR**
A8	Descarboxilação de lisina	**LIS**
A9	Descarboxilação de arginina	**ARG**
A10	Descarboxilação de omitina	**ORN**
A11	Malonato	**MLN**
A12	Oxidação de glicose	**GLIC**

Painel	Prova	Abreviação
B1	Fermentação de lactose	**LAC**
B2	Fermentação de sacarose	**SAC**
B3	Fermentação de manitol	**MAN**
B4	Fermentação de adonitol	**ADO**
B5	Fermentação de mioinositol	**MIO**
B6	Fermentação de sorbitol	**SOR**
B7	Fermentação de rafinose	**RAF**
B8	Fermentação de ramnose	**RAM**
B9	Fermentação de maltose	**MAL**
B10	Fermentação de melobiose	**MEL**
B11	ß-D-galactosidase	**ONPG**
B12	Hidrólise da esculina	**ESC**

PROCEDIMENTO
Os testes devem ser realizados a partir de colônias isoladas e puras com 18 a 24 horas de crescimento, preferencialmente a partir de meios não seletivos.

- Abrir o envelope e retirar o painel.
- Guardar o envelope para incubação do painel.
- Turvar 3 a 4 mL da Solução Inoculante Probac do Brasil ® na escala 0,5 McFarland.
- Distribuir 0,1 mL (100 µl) desta turvação, bem homogeneizada, em cada pocinho da microplaca, com auxílio de uma pipeta estéril. Para uso de pipeta multicanal a Probac do Brasil comercializa separadamente uma canaleta que auxilia na inoculação.
- Nos pocinhos dos aminoácidos (A7 a A10), adicionar uma gota da solução estabilizante de aminoácidos que acompanha o kit e a seguir pingar duas gotas do óleo mineral estéril nas provas que estão sublinhadas.
- Pingar também duas gotas de óleo mineral estéril nas provas sublinhadas: H_2S (A4) e Uréia (A5)
- Realizar a prova de oxidase do isolado: Retire uma fita e feche imediatamente o frasco. Com uma alça de platina ou bastão de vidro ou madeira, faça um esfregaço da bactéria a ser identificada na fita. Não utilize nenhum tipo de alça ou bastão que contenha

PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
Rua Jaguaribe, 35 – Sta.Cecília - São Paulo – SP - CEP: 01224-001
Fone: 55 11 3367-4777 - Fax: 55 11 3223-8368
CNPJ 45.597.176/0001-00 -Insc. Est. 110.485.842.111
Site: www.probac.com.br E-mail: probac@probac.com.br

PROBAC DO BRASIL

vestígios de ferro, pois este irá catalisar a reação de oxidação do reagente, resultando em reação falso-positiva. Na mesma fita, faça controle positivo com *Pseudomonas aeruginosa* e controle negativo com *Escherichia coli*. Anotar o resultado no painel.
- Colocar o painel na embalagem e incubar 35ºC± 2ºC por 18-24 horas.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO:
1. Fundamentos das Reações:
- Indol: As enterobactérias que possuem a enzima triptofanase, em meios contendo triptofano produzem indol. O indol é um dos produtos de degradação imediata da desaminação do triptofano, e pode ser detectado pela reação com o Reativo de Kovacs, resultando em um composto colorido.
- Voges Proskauer: A glicose pode ser metabolizada pelos microrganismos, através de diferentes vias metabólicas. De acordo com a via utilizada, se formarão produtos finais ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), ou produtos finais neutros (acetil metil carbinol). Esta diferença no metabolismo bacteriano pode ser reconhecida pela adição hidróxido de potássio e alfa naftol em um meio com indicador para evidenciar a presença de produtos finais neutros.
- Citrato de Simmons: verifica a utilização do citrato como única fonte de carbono.
- H_2S: detecta a capacidade de certo microrganismos liberarem enzimaticamente enxofre a partir de enxofre inorgânico como compostos de sulfeto de hidrogênio (H_2S).
- Uréia: verifica a presença da enzima urease que hidrolisará a uréia.
- Triptofano desaminase: teste usado para diferenciação entre bacilos Gram negativos urease positivos baseado na capacidade dos microrganismos produzirem ácido indolpirúvico. A desaminação do triptofano a ácido indolpirúvico é detectada pela adição de cloreto férrico.
- Lisina, Arginina, Ornitina: são testes que demonstram a capacidade de um organismo descarboxilar um aminoácido em amina resultando em alcalinidade do meio. A base usada é à Base de Moeller.
- Malonato: Utilização de malonato como única fonte de carbono.
- Hidrólise da esculina: demonstra a capacidade do microrganismo hidrolisar a esculina resultando em coloração enegrecida do meio.
- Fermentação dos açucares: a fermentação de um açúcar resulta na formação de ácidos que diminuem o pH do meio causando alteração de cor.
- ONPG: usada na diferenciação dos membros da enterobacteriaceae baseada na atividade da ß-D-galactosidase, que é uma das enzimas que determina a capacidade da bactéria fermentar lactose.
- Oxidase: teste diferencial muito importante na identificação de bactérias Gram negativas. As bactérias que produzem a enzima oxidase apresentam um sistema de transporte de elétrons, denominado *sistema citocromo oxidase*. Neste sistema, os aceptores eletrônicos naturais podem ser substituídos por substratos artificiais, que, na presença de oxigênio atmosférico, são oxidados pela citocromo oxidase, formando um composto colorido.

2. Revelação das provas:
- Oxidase: A leitura é feita em poucos segundos:
- Oxidase (+): O esfregaço bacteriano na fita apresenta coloração rosa, que após alguns minutos pode mudar para preta.
- Oxidase (–): O esfregaço bacteriano não apresenta alteração de cor.

Algumas provas bioquímicas necessitam de reagentes, que devem ser adicionados após a incubação, para que o resultado possa ser visualizado:

- Indol (A1): Pingar 03 gotas de Reativo de Kovacs.
- Voges Proskauer (A2): Pingar 01 gota de Hidróxido de Potássio 40% + 01 gota de Alfa-naftol 5% (seguir a ordem descrita dos regentes). Aguardar 15 minutos antes da leitura.
- **Triptofano desaminase (A6):** Pingar 01 gota de Cloreto Férrico 10%.

3. Leitura:

Prova	Reação Positiva	Reação Negativa
Indol	Rosa	Amarelo
VP	Vermelho	Amarelo
Citrato de Simmons	Azul	Verde ou incolor
H_2S	Preto	Inalterado
Uréia	Rosa	Amarelo
Triptofano desaminase	Marrom intenso	Inalterado ou marrom claro
Malonato	Verde	Amarelo
Lisina, Arginina e Ornitina	Cor púrpura do meio mais acentuada que a do poço controle	Cor do meio igual ou mais amarelada que a do poço controle
ONPG	Amarelo	Inalterado
Hidrólise da esculina	Preto	Inalterado
Utilização dos açúcares	Amarelo	Vermelho

4. Resultados: Após a leitura das provas, os resultados devem ser preenchidos no banco de dados que acompanha o produto na primeira compra e é instalado pela Probac ou um de seus distribuidores. O sistema indicará qual o nome e espécie do microrganismo isolado e sua probabilidade.

PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
Rua Jaguaribe, 35 – Sta.Cecília - São Paulo – SP - CEP: 01224-001
Fone: 55 11 3367-4777 - Fax: 55 11 3223-8368
CNPJ 45.597.176/0001-00 -Insc. Est. 110.485.842.111
Site: www.probac.com.br E-mail: probac@probac.com.br

PROBAC DO BRASIL

5. Uso do Banco de Dados:
Abrir o Programa Painel para Enterobactéria.

1. Selecionar: Resultados.
2. Informar o resultado da prova de Oxidase (+ ou -).
3. Colocar os resultados: + em caso de reações positivas e – caso de reações negativas em cada um dos substratos.
4. Selecionar: Gravar: o resultado aparece na tela em poucos segundos.
5. Os resultados podem ser impressos
6. O programa permite a visualização de relatórios dos resultados obtidos.

Em caso de não aparecer nenhum nome de bactéria na tela:
Checar os resultados lidos e marcados no computador.

A) Checar a pureza da cepa.
B) Checar se é um bacilo Gram negativo fermentador de glicose.
C) As *Aeromonas sp* e as *Plesionomas sp* aparecem no diagnóstico diferencial dos bacilos Gram negativos fermentadores de glicose, oxidase positivos.

CUIDADOS:
- Não utilizar painéis sem embalagem integra.
- Não utilizar o produto na presença de sinais de contaminação.

OBSERVAÇÃO:
Materiais não fornecidos juntamente com o painel, mas disponíveis para venda na Probac do Brasil:
- Escala de McFarland
- Canaleta para auxiliar na inoculação com pipeta multicanal (não disponível para venda).
- Tubos estéreis (não disponível para venda).

PRECAUÇÕES:
Este material após o uso deve ser descartado conforme as recomendações vigentes para resíduos de serviços de saúde.
O Reativo de Kovacs pode apresentar escurecimento, passando de amarelo a castanho esverdeado. Essa característica é peculiar da matéria-prima Dimetilaminobenzaldeído e não impacta no desempenho do produto.

APRESENTAÇÃO:
Caixa com 10 Painéis, 1 frasco de Solução Inoculante com 50 mL, 1 frasco com 2 mL de Solução Estabilizante de Aminoácidos, 1 frasco com Óleo Mineral com 4 mL, 1 frasco com Cloreto Férrico 10% com 1mL, 1 frasco com Reativo de Kovacs com 1mL, 1 frasco com Hidróxido de Potássio 40% com 1mL, 1 frasco com Alfa Naftol 5% com 1 mL e 01 frasco com 10 Fitas para Determinação de Oxidase.

CONSERVAÇÃO:
Painel, Solução Inoculante: Conservar entre 10º e 25ºC.
Óleo Mineral, Hidróxido de Potássio 40%, Alfa Naftol 5%: Conservar entre 10º e 30ºC.
Solução Estabilizante de Aminoácidos, Cloreto Férrico 10 e Reativo de Kovacs: Conservar em geladeira (2° a 8°C).
Fitas para Determinação de Oxidase: Conservar em geladeira (2° a 8°C), ao abrigo da luz.

VALIDADE: 4 meses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:
1.Murray, P.R. et al. – Manual of Clinical Microbiology, 9th ed., ASM Press, Washington, DC, 2007.
2. Washington, W.J.; Allen, S.D. et al- Koneman´s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition. Lippincott Willians and Wilkins, Philadelphia, 2006.

PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
Rua Jaguaribe, 35 – Sta.Cecília - São Paulo – SP - CEP: 01224-001
Fone: 55 11 3367-4777 - Fax: 55 11 3223-8368
CNPJ 45.597.176/0001-00 -Insc. Est. 110.485.842.111
Site: www.probac.com.br E-mail: probac@probac.com.br

ANEXO II

Primer	Sequence (5' – 3')	Size (pb)	Annealing	Reference
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	~1360	56ºC	Turner et al., 1999
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T			
BOX A1R	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	ND	53°C	Rademaker and de Bruijn, 1997
NDM-F	GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC	621	56ºC	Poirel et al., 2011
NDM-R	CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC			
VIM-F	GAT GGT GTT TGG TCG CAT ATC G	390	58ºC	
VIM-R	GCC ACG TTC CCC GCA GAC G			
IMP-F	GAA TAG AGT GGA TTA ATT CTC	232	55ºC	
IMP-R	CGT TTA ACA AAA CAA CCA CC			
SIM-F	TAC AAG GGA TTC GGC ATC G	570		
SIM-R	TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG			
DIM-F	GCT TGT CTT CGC TTG CTA ACG	699		
DIM-R	CGT TCG GCT GGA TTG ATT TG			
GIM-F	TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA	477	52ºC	
GIM-R	AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC			
SPM-F	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG	271		
SPM-R	ACA TTA TCC GCT GGA ACA GC			
AIM-F	CTG AAG GTG TAC GGA AAC AC	322		
AIM-R	GTT CGG CCA CCT CGA ATT			
KPC-F	TGT CAC TGT ATC GCC GTC	798		
KPC-R	CGT TGA CGC CCA ATC C			
GES-F	ATG CGC TTC ACG CAC	642	52ºC	
GES-R	CTA TTT GTC CCT CAG G			
TEM-F	AAA GAT GCT GAA GAT CA	425	44ºC	
TEM-R	TTT GGT ATG GCT TCA TTC			
CTX-F	GTG CAG TAC CAG TAA AGT TAA G	550	55°C	

CTX-R	CGC AAT ATC ATT GGT GGT GCC			
SHV-F	GCG AAA GCC AGC TGT CGG GC	304	62°C	
SHV-R	GAT TGG CGG CGC TGT TAT CGC			
OXA-F	ACA CAA TAC ATA TCA ACT TCG C	438	52°C	
OXA-R	AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC			
BIC-F	TAT GCA GCT CCT TTA AGG GC	537		
BIC-R	TCA TTG GCG GTG CCG TAC AC			
OmpA-F	ATT GCA GTC GCA CTG GCT GG	1100	60ºC	
OmpA-R	GCC TGC GGC TGA GTT ACA AC			
OmpC-F	GTT AAA GTA CTG TCC CTC CTG	1200	54ºC	Santos et al., 2017
OmpC-R	GAA CTG GTA AAC CAG ACC CAG			
OmpF-F	AGC GCA ATA TTC TGG CAG TG	1000		
OmpF-R	CTG GTA AAC GAT ACC CAC AG			
OmpK35-F	CAG ACA CCA AAC TCT CAT CAA	~1080		
OmpK35-R	AGA ATT GGT AAA CGA TAC CCA			
OmpK36-F	CAG CAC AAT GAA TAT AGC CGA	~1110	60ºC	
OmpK36-R	GCT GTT GTC GTC CAG CAG GTT			
OmpK37-F	CAT TCC GCA GAA TGA GAC GGC	~1115		
OmpK37-R	CGA CGA TGT TAT CGG TAG AGA			
IntI 1-F	ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC G	500	65°C	
IntI 1-R	CTG GAT TTC GAA TCA CGG CAC G			
IntI 2-F	GCA AAC GCA AGC ATT CAT TA	400	62°C	Santos et al., 2017
IntI 2-R	ACG GAT ATG CGA CAA AAA GG			
IntI 3-F	AGT GGG TGG CGA ATG AGT G	600	55°C	
IntI 3-R	TGT TCT TGT ATC GGC AGG TG			

ANEXO III

Tabela I - Resultados obtidos para metalo β-lactamases, para os seguintes genes testado: *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{SIM}$, *bla*$_{DIM}$, *bla*$_{GIM}$, *bla*$_{SPM}$ e *bla*$_{AIM}$. Os resultados foram representados em ausência (-) e presença (+).

	Genes para metalo β-lactamases							
	NDM	VIM	IMP	SIM	DIM	GIM	SPM	AIM
(1) *B. aquatica*	-	-	-	-	-	-	-	-
(2) *L. grimondii*	-	-	-	-	-	-	-	-
(3) *L. richardii*	-	-	-	-	-	-	-	-
(4) *R. ornithinolytica*	-	-	-	-	-	-	-	-
(5) *E. coli*	-	-	-	-	-	-	-	-
(6) *R. plantiocola*	-	-	-	-	-	-	-	-
(7) *K. pneumoniae*	-	-	-	-	-	-	-	-
(8) *E. coli*	-	-	-	-	-	-	-	-
(9) *E. coli*	-	-	-	-	-	-	-	-
(10) *E. bugandensis*	-	-	-	-	-	-	-	-
(11) *E. coli*	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela II – Resultados obtidos para β-lactamases (*bla*$_{GES}$, *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{OXA}$, *bla*$_{BIC}$ e *bla*$_{KPC}$). Os resultados foram representados em ausência (-) e presença (+).

	Genes para β-lactamases						
	GES	TEM	CTX	SHV	OXA	BIC	KPC
(1) *B. aquatica*	-	-	-	-	-	-	-
(2) *L. grimondii*	-	-	-	-	-	-	-
(3) *L. richardii*	-	-	-	-	-	-	-
(4) *R. ornithinolytica*	-	-	-	-	-	-	-
(5) *E. coli*	-	-	-	-	-	-	-
(6) *R. plantiocola*	-	-	-	-	-	-	-
(7) *K. pneumoniae*	-	-	-	-	-	-	-
(8) *E. coli*	-	-	-	-	-	-	-
(9) *E. coli*	-	-	-	-	-	-	-
(10) *E. bugandensis*	-	-	-	-	-	-	-
(11) *E. coli*	-	-	-	-	-	-	-