



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA MOLECULAR)

LUIS JANSSEN

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E IMPACTO ANTRÓPICO EM
MICROORGANISMOS PROSPECTADOS NO LAGO PARANOÁ, BRASÍLIA, DF

BRASÍLIA

2021

LUIS JANSSEN

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E IMPACTO ANTRÓPICO EM
MICRORGANISMOS PROSPECTADOS NO LAGO PARANOÁ, BRASÍLIA, DF**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

Orientador: Vicente de Paulo Martins

BRASÍLIA

2021

Nome: Luis Janssen

Título: Potencial biotecnológico e impacto antrópico em microrganismos prospectados no lago Paranoá, Brasília, DF

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

Aprovado em: __ / __ / __

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins

Instituição: Universidade de Brasília.

Assinatura _____

Membro Interno - Profa. Dra. Cynthia Maria Kyaw. Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____ Assinatura _____

Membro Externo - Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling. Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura _____

Membro Externo - Prof. Dr. André Pitondo da Silva. Instituição: Universidade de Ribeirão Preto

Julgamento: _____ Assinatura _____

Membro Interno (Suplente) - Prof. Dr. Ricardo Kruger Instituição.: Universidade de Brasília

Julgamento: _____ Assinatura _____

A meu tio Chico, *in memoriam*. Essa tese
é de nós dois.

À minha mãe Esther e minha tia Mariana, pelo apoio incondicional e estímulo a minha formação. Seu apoio foi e é fundamental para os meus sonhos.

Ao meu orientador Vicente, a quem é mais fácil ver como um colega veterano do que como um orientador, pela paciência incansável e ensinamentos; Também agradeço à professora Tatiana, por sua generosidade em ensinar.

Aos muitos colegas e amigos com quem pude conviver, trocar conhecimentos e compartilhar boas memórias. Hérick, Anderson, George, Tauana, Paloma, Laura, Ana Paula, Isabella, Rafaella, Isadora, Carlos Magno, Aline, Felipe, Nicholas... Essa lista certamente está incompleta, não faz justiça. Se acaso o seu nome não esteja aqui e você sinta que deva estar, podemos resolver isso com conversa e risadas além desse texto.

Em particular, gostaria de agradecer minhas amigas Thaís e Ketlin. Se nada mais desse certo, a oportunidade de trocar saberes e afeto com vocês já teria feito o tempo valer a pena.

A esta Universidade-casa, seus professores e funcionários.

Às agências CNPq, CAPES e FAPDF pelo auxílio financeiro.

“Nosso tempo é especialista em criar ausências: do sentido de viver em sociedade, do próprio sentido da experiência da vida. Isso gera uma intolerância muito grande com relação a quem ainda é capaz de experimentar o prazer de estar vivo, de dançar, de cantar. E está cheio de pequenas constelações de gente espalhada pelo mundo que dança, canta, faz chover. O tipo de humanidade zumbi que estamos sendo convocados a integrar não tolera tanto prazer, tanta fruição de vida. Então, pregam o fim do mundo como uma possibilidade de fazer a gente desistir dos próprios sonhos. E a minha provocação sobre adiar o fim do mundo é exatamente sobre poder contar mais uma história. Se pudermos fazer isso, estaremos adiando o fim.” – Ailton Krenak

Sumário

1	Resumo geral.....	13
2	abstract.....	15
Capítulo 1 – Prospecção de microrganismos para a degradação de xenobióticos em ambientes aquáticos.....		
3	Resumo do capítulo 1.....	17
4	Introdução.....	18
4.1	Água e sua proteção.....	20
4.2	Poluição e Xenobióticos.....	22
4.3	Cafeína e Paracetamol.....	25
4.4	Biorremediação.....	28
5	Justificativa.....	40
6	Objetivos.....	41
6.1	Objetivo Geral.....	41
6.2	Objetivos Específicos.....	41
7	Material e Métodos.....	42
7.1	Prospecção e isolamento de microrganismos.....	42
7.2	Amplificação de fragmento do gene codificador do rRNA 16S por PCR, sequenciamento e busca em banco de dados.....	42
7.3	Sequenciamento, montagem e anotação do genoma bacteriano.....	43
7.4	Quantificação de biofilme por violeta de genciana.....	44
7.5	Microscopia Eletrônica de varredura.....	45
7.6	Enriquecimento de pigmento marrom e análise de solubilidade.....	46
7.7	Espectroscopia em espectro de luz ultravioleta e visível.....	46
7.8	Espectroscopia em infravermelho por transformada de fourier (ftir).....	47
7.9	Análise de termogravimetria.....	47
7.10	Curva de Crescimento do Isolado KpV3.....	47
7.11	Análise dos genes potencialmente envolvidos na degradação de paracetamol.....	48
8	Resultados e Discussão.....	49
8.1	Prospecção de microrganismos para a degradação de xenobióticos.....	49
8.2	Identificação taxonômica do isolado.....	52
8.3	Colonização sobre partículas de carvão pelo isolado KpV3.....	60
8.4	Análises físico-químicas do pigmento marrom obtido a partir de culturas microbianas com paracetamol.....	63
8.5	Crescimento do isolado KpV3 em meio mínimo M9 contendo cafeína ou paracetamol.....	69
9	conclusões do capítulo 1.....	75
capítulo 2 – Avaliação das características de interesse médico do isolado KpV3.....		
10	Resumo do capítulo 2.....	77
11	introdução.....	78
11.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	80
11.2	Resistência aOS antimicrobianos.....	83
11.3	Virulência.....	96
11.4	Transposons.....	100
11.5	Vigilância genômica.....	106
12	Justificativa.....	110

13 Objetivo.....	111
13.1 Objetivo Geral.....	111
13.2 Objetivos específicos.....	111
14 Material e Métodos.....	112
14.1 Crescimento em meio ágar McConkey.....	112
14.2 Contrastação negativa por tinta nanquim.....	112
14.3 Série Bioquímica.....	112
14.4 Antibiograma.....	113
14.5 Análises genômicas do isolado kpv3 de interesse médico.....	114
14.6 Genômica comparativa.....	114
15 Resultados e discussão.....	115
15.1 Caracterizações fenotípicas.....	115
15.2 Antibiograma.....	116
15.3 Tipagem molecular e genes de virulência.....	117
15.4 Genes de resistência a antimicrobianos e elementos gênicos móveis.....	119
15.5 Genômica comparativa.....	126
16 Conclusões do capítulo 2.....	135
17 Bibliografia.....	136
18 Apêndice A – <i>Proof</i> da publicação obtida a partir da tese.....	152
19 anexo A – documento de cadastro na plataforma sisgen acerca da linhagem kpv3.....	163

Lista de figuras

Figura 1. Toxicidade comparativa de diferentes xenobióticos.	27
Figura 2: Curvas de probabilidade de exposição ambiental de cafeína por estudo analisado em meta-análise.	29
Figura 3. Concentração de Moléculas poluentes não-monitoradas pela legislação europeia, mas para as quais existem ao menos dez estudos entre 2012 e 2017.	30
Figura 4. Esquema geral de funcionamento de uma célula de combustível microbiana.	32
Figura 5. Oxidação clássica de sulfeto de hidrogênio por microrganismos terrestres versus oxidação eletrogênica.	33
Figura 6. Vias metabólicas para a biorremediação de paracetamol por microrganismos.	36
Figura 7. Via de N-demetilação da cafeína em <i>P. putida</i> CBB5.	38
Figura 8. Via de oxidação em C8 de cafeína proposta para <i>Pseudomonas</i> sp. CBB1.	39
Figura 9. Oxidação em C8 de metabólitos oriundos da via de demetilação.	40
Figura 10. Imagem de satélite da estação de tratamento de esgoto norte da CAESB.	51
Figura 11. Placas de meio M9 suplementados com de paracetamol.	53
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos <i>amplicons</i> obtidos a partir de PCR em gradiente feito a partir do DNA genômico extraído da cepa KpV3.	55
Figura 13. Alinhamento entre a sequência obtida a partir do sequenciamento do iniciador senso <i>do amplicon</i> da PCR contra fragmento do gene codificador para rRNA 16S (<i>Query</i>) e o melhor <i>hit</i> encontrado no banco <i>Nucleotide</i> para essa sequência (<i>Sbjct</i>).	56
Figura 14. Alinhamento entre a sequência obtida a partir do sequenciamento do iniciador antisenso do amplicon da PCR contra fragmento do gene codificador para rRNA 16S (<i>Query</i>) e o melhor <i>hit</i> encontrado no banco <i>Nucleotide</i> para essa sequência (<i>Sbjct</i>).	57
Figura 15. Capacidade de diferenciação de <i>K. pneumoniae</i> e espécies recentemente descritas para o gênero <i>Klebsiella</i> em diferentes métodos.	58
Figura 16. Análise de completude do genoma do isolado KpV3.	61
Figura 17. Produção de biofilme pelo Isolado KpV3 em quantificação de biofilme por cristal violeta.	63
Figura 18. Microscopia Eletrônica de Varredura do isolado KpV3 sobre lamínula de vidro em aumento de 5000x.	64
Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura do isolado V3 sobre partículas de carvão. .	64
Figura 20. Isolado kpV3 crescido em meio M9 suplementado com 500 mg.L ⁻¹ de paracetamol	65
Figura 21. Exemplos de estruturas moleculares contendo a função quinona.	66
Figura 22. Espectro de absorvância de luz nas faixas de ultravioleta e visível do pigmento marrom.	68
Figura 23. Espectro de absorvância de luz na faixa de infravermelho obtido a partir da análise de FTIR para o pigmento marrom.	70
Figura 24. Curva de oscilação de massa em função de temperatura obtido para o pigmento marrom em ensaio de termogravimetria.	71
Figura 25. Curva de crescimento do isolado V3 em meio contendo apenas Paracetamol ou cafeína como fontes de carbono ao longo de 72 h.	72
Figura 26. Principais vias bioquímicas potencialmente relacionadas à degradação de paracetamol no isolado KpV3.	72

Figura 27. Estruturas moleculares do ácido 4-hidroxifenilacético e do acetoaminofeno. A mudança entre as moléculas é a substituição entre a função ácido carboxílico pela função amida.	74
Figura 28. Exemplos de estruturas moleculares para as quais há registro como substrato da enzima 4-hidroxifenolacetato 3-hidroxilase de <i>E.coli</i>	74
Figura 29. Alinhamento por tBLASTn entre a sequência de 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilase de <i>E.coli</i> (Número de acesso PDB6EB0) e o cromossomo de KpV3.....	75
Figura 30. Desenho esquemático das reações químicas hipotéticas para a formação de melaninas a partir de paracetamol no isolado KpV3.	76
Figura 31. Estruturas moleculares de moléculas representativas dos principais beta-lactâmicos.	88
Figura 32. Linha do tempo do uso de beta-lactâmicos e aquisição de resistência em <i>K. pneumoniae</i>	90
Figura 33. Linha do tempo do uso de aminoglicosídeos e aquisição de resistência em <i>K.pneumoniae</i>	92
Figura 34. Linha do tempo do uso de quinolonas e aquisição de resistência em <i>K. pneumoniae</i>	94
Figura 35. Linha do tempo do uso de polimixinas e aquisição de resistência em <i>K. pneumoniae</i>	96
Figura 36. Linha do tempo do uso de tigeciclina e aquisição de resistência em <i>K. pneumoniae</i>	97
Figura 37. Principais fatores de virulência descritos para CKps e HVkps.	98
Figura 38. Principais formas de transmissão horizontal de genes e elementos gênicos envolvidos.	104
Figura 39. Caracterização morfológica inicial do isolado V3.	116
Figura 40. Predição de domínios proteicos codificados a partir dos genes vgrg de KpV3 no programa CDvist.....	119
Figura 41. Representação gráfica no navegador genômico Artemis de identidade entre contig 3 do genoma de KpV3 e seu melhor hit em nBLAST.	124
Figura 42. Representação gráfica em navegador genômico Artemis entre o contig 7 do genoma de KpV3 (acima) e um de seus melhores hits em nBLAST.	124
Figura 43. Representação gráfica em navegador genômico Artemis que dá destaque a ocorrência múltipla de hits entre o contig 7 de Kpv3 e o plasmídeo de <i>E.coli</i> MK370991.1. .	125
Figura 44. Composição gênica de NTEKPCs encontrados no isolado KpV3 e demais transposons do tipo na literatura.	127
Figura 45. Árvore de STs para a espécie <i>K.pneumoniae</i> obtida a partir do banco de dados BIGSdb.	129
Figura 46. Filogenia de genomas de <i>K. pneumoniae</i> com valores de ANI>99% em relação a Kpv3 depositados em Genbank.	131
Figura 47. Índices de similaridade e cobertura entre contigs do genoma de Kpv3 e de KpBSB31.	132
Figura 48. Disperção de genes por <i>K. pneumoniae</i> entre diferentes biotas.	134

Lista de tabelas

Tabela 1. Cepas bacterianas relatadas na literatura científica capazes de degradar cafeína, seus locais de isolamento e suas vias de degradação.....	39
Tabela 2. Sumário das características do genoma de KpV3 após montagem e anotação.....	59
Tabela 3. Valores de ANI referentes aos quatro genomas depositados em Genbank com maior similaridade em relação ao genoma de KpV3.....	60
Tabela 4. Solubilidade da substância marrom em diferentes solventes.....	65
Tabela 5. Resultado de triagem bioquímica do isolado V3 em meio Rugai com Lisina após 24 h de incubação a 25°C.....	114
Tabela 6: Resultados de antibiograma para KpV3.....	115
Tabela 7. Tabela de mutações pontuais derivada da análise do programa Resfinder.....	118
Tabela 8. Resultados de identificação de plasmídeos a partir do programa Plasmidfinder..	119
Tabela 9: Sumário das características genéticas do isolado KpV3 que contribuem para os fenótipos de resistência a antimicrobianos e virulência.....	120

Lista de abreviaturas

AMR – *Antimicrobial Resistance*
ANI – *Average Nucleotide Identity*
BUSCO - *Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*
CAESB – *Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal*
CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*
CG – *Clonal Group*
Ckp – *classic Klebsiella pneumoniae*
Contig – *Contiguous Sequence*
CRkp – *Carbapenem Resistant Klebsiella pneumoniae*
DF – *Distrito Federal*
DHI - 5,6-dihidroxi-indol
DHICA - 5,6-dihidroxi-indol-2-Carboxílico
DMSO – *Dimetilsulfóxido*
DNA - *Ácido Desoxiribonucleico*
dNTPs – *desoxinucleotídeos trifosfatados*
DUF – *Domain of Unknown Function*
EC50 - *Concentração para qual está 50% do seu efeito máximo*
EDX – *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*
ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPR - *Electron Paramagnetic Resonance*
ESBLs- *Extended Spectrum Beta-Lactamase*
ESKAPEE - *Enterococcus faecium., Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp. and Escherichia coli*
FTIR - *Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy*
h – *hora*
HGT – *Horizontal Gene Transfer*
HPLC- MS – *High Pressure Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
HUB – *Hospital Universitário de Brasília*
Hvkp – *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*
ICE - *integrative and conjugative elements*
IPCC - *Intergovernmental Panel on Climate Change*
IS – *Insertion Sequence*
IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*
Kb – *Kilobase*
KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
L - *Litro*
L-DOPA - *L-2,3-dihidroxifenilalanina*
LPS - *Lipopolysaccharide*
M – *Molar*
MALDI-TOF/MS – *Matrix Assisted Laser Desorption ionization- Time of Flight/ Mass Spectrometry*
MDR – *Multidrug resistant*
meio LB – *Luria - Bertani*
mg - *miligrama*

MLST – *Multilocus Sequence Tagging*
mM – Milimolar
N50 – Menor sequência de *contig* para 50% do genoma
NAPQI - N-acetil-p-benzo-quinona imina
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
ng - nanograma
NGS – *Next Generation Sequencing*
nm – nanômetro
NSAID - *Non-steroidal anti-inflammatory drugs*
NTEKPC - *Non-Tn4401-Elements Klebsiella pneumoniae carbapenemase*
OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS - Organização Mundial de Saúde
ONU - Organização das Nações Unidas
PAMP - *pathogen-associated molecular pattern*
pb- pares de base
PBP – *Penicillin Binding Protein*
PBS – *Phosphate Buffer Saline*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PDR -*Pan drug Resistant*
PFA – Paraformaldeído
PFGE – *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*
pH – Potencial hidrogeniônico
POPs- Poluentes Orgânicos Persistentes
qPCR – *quantitative polymerase chain reaction*
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
rmp – *regulator of mucoid phenotype*
RNA - Ácido Ribonucleico
RPM – Rotações Por Minuto
SB – *Sodium Borate*
Sbjct – *Subject*
SIGEX - *substrate induced gene expression*
SisGen - O Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
ST – *Strain type*
T6SS – *Type 6 Secretion System*
Taq - *Thermus aquaticus*
TGA – *Thermogravimetric Analysis*
THN - 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno
Tn - Transposon
TYGS – *Type Strain Genome Server*
U – Unidades
UFCs- Unidades Formadoras de Colônias
UV-Vis – Ultravioleta-Visível
XDR- *Extensively drug resistant*
µL – microlitro

1 RESUMO GERAL

Poluição ambiental pode ser compreendida como o espalhamento de um material em um ambiente, de forma que esse tenha efeitos nocivos à biota que lá existe ou interage. Dentre os tipos de poluente, é possível se listar os poluentes convencionais, de origem natural e finitos, tais como hidrocarbonetos oriundos do petróleo; os poluentes xenobióticos, artificiais e finitos, tais como fármacos e agrotóxicos e os elementos xenogenéticos, gerados a partir de ações antrópicas e capazes de se reproduzir em seus hospedeiros, tais como plasmídeos epidêmicos. Em uma perspectiva de saúde única, a saúde humana é dependente e relacional com a saúde de animais domésticos e do meio ambiente como um todo, de forma que se faz necessário entender e mitigar as ações antrópicas nocivas ao meio ambiente. Em uma primeira etapa do presente estudo, foi feita a prospecção de microrganismos capazes de degradar cafeína e paracetamol, dois dos poluentes mais comuns em ambientes aquáticos, a partir de uma amostra de água superficial do lago Paranoá. Ao final da prospecção por enriquecimento, foi isolada uma colônia de bactérias, as quais eram capazes de crescer em meios mínimos contendo apenas um dos fármacos como fonte única de carbono e energia. Análises bioquímicas e genômicas identificaram a espécie do isolado como *Klebsiella pneumoniae*. Curiosamente, esse isolado produz um pigmento marrom apenas em culturas com paracetamol e análises espectroscópicas em ultravioleta, luz visível e infravermelho sugerem tratar-se de uma melanina, o que pode levar futuramente a aplicações biotecnológicas, tais como o uso dessas na remoção de novos poluentes, em uma segunda ordem de despoluição. Análises genômicas indicam a presença de genes e vias metabólicas de degradação desses fármacos, porém a ainda é necessária sua comprovação experimental. Em uma segunda etapa, foram avaliadas características de interesse médico do isolado, com foco em análises genômicas. Análises de *average nucleotide identity* (ANI) e *in silico Multilocus sequence typing* (MLST) revelam o isolado como pertencente a uma nova linhagem de *K. pneumoniae*, cujo número de linhagem tipo (*strain type*) foi depositado em banco de dados da espécie. O antibiograma do isolado mostra que esse possui o fenótipo de multirresistência a antibióticos, dentre eles quinolonas, cefalosporinas e carbapenems. Análises genômicas apontaram para poucas evidências relacionadas à hipervirulência do isolado, no entanto foram detectados grupos de genes relacionados à virulência e foram encontrados genes de resistência, incluindo

genes de beta-lactacamase de espectro estendido e de carbapenemase, esse último associado a um transposon não descrito na literatura. O isolado também possui um *contig* extracromossômico idêntico a uma sequência observada em uma cepa de *K. pneumoniae* hospitalar, o que indica a presença de um fluxo de genes entre a rede de hospitais do Distrito Federal e o lago Paranoá, com novos estudos sendo necessários para um melhor entendimento deste fluxo. O achado de uma cepa bacteriana multirresistente no lago Paranoá é preocupante, uma vez que esse é utilizado para fins recreativos pela população local, bem como fonte de captação de água potável, ainda que existam processos a jusantes de tratamento desta. Por fim, estudos na literatura indicam a correlação no aumento de temperatura ambiental e aumento no número de infecções com bactérias multirresistentes a antibacterianos em humanos. Fatores bioquímicos de bactérias a mudanças nas sociedades humanas têm sido apontados como possíveis hipóteses para essa correlação e o reuso de água com bactérias multirresistentes pode ser um fator a contribuir com esta.

Palavras-chave: Poluição, biorremediação, melanina, *Klebsiella pneumoniae*, resistência a antimicrobianos.

2 ABSTRACT

Environmental pollution can be understood as the spread of a material in an environment, such that it causes harmful effects in its existing or interacting biota. Among the different types of pollution, there are the conventional, of natural sources and finite, such as oil borne hydrocarbons; the xenobiotic, generated as a result of anthropic activities and finite, such as pharmaceuticals and agrotoxics and the xenogeneic, also resulted from human activities, but with the capacity of replication in their hosts, such as epidemic plasmids. Under the One Health perspective, human health depends on and relates with the health of domestic animals and the environment as a whole, so that it becomes necessary to understand and mitigate harmful effects of human actions in the environment. In the first part of the present study, microbes were prospected in function of their capacity for biodegrading caffeine and acetoaminophen, two of the most common xenobiotics in water bodies. This prospection was based on water samples from the local Paranoá lake. By the end of the prospection, a colony of bacteria was isolated, which was capable of growth in M9 minimal medium supplemented with either caffeine or acetoaminophen as sole carbon and energy sources. Biochemical and genomic analyses identified these bacteria as belonging to the *Klebsiella pneumoniae* species. Curiously, these bacteria were able to produce a brown pigment when in contact with acetoaminophen. Spectroscopic analyses in ultraviolet, visible and infrared light indicate that this pigment is a melanin, which may lead to future biotechnological applications, such as its use to remove new pollutants in an environment, as a second-order depollution. Genomic analysis of the isolate point towards the presence of metabolic pathways potentially involved in the biodegradation of these drugs; however further experimental assays are needed to demonstrate this capacity. In the second part of the study, medically relevant features of the bacterial isolate were analyzed, with a focus on genomic analysis. Average Nucleotide Identity (ANI) and Multilocus Sequence Typing indicate that this isolate represents a novel strain for the species, whose Strain Type was deposited in a database of *K. pneumoniae*. The antibiogram of the isolate shows that it possesses the multidrug resistance phenotype which comprehends resistance to quinolones, cephalosporins and carbapenems. Genomic analysis found little evidence related to the hypervirulent phenotype, though genes clusters related to virulence and related to drug resistance have been found, including genes of extended-

spectrum beta-lactamase and carbapenemase, the latter of which associated with an undescribed transposon in the literature. The isolate also has an extrachromosomal contig that is identical to a sequence found in a local hospital strain, which points toward the presence of a gene flow from local hospitals into the lake, with further studies necessary to test this possibility. This hypothesis is concerning, given that the lake is used for recreational purposes by the local population and it is used as a reservoir for water reuse, including drinking water, even though there are downstream water treatment processes. Finally, there are studies in the literature which present a correlation between increases in environmental temperature and number of antibacterial-resistant bacterial infections in humans. Factors ranging from biochemical pathways to human societal changes have been attributed as possible causes for this correlation and water reuse with antimicrobial resistant bacteria may be one contributing factor.

Keywords: Pollution, bioremediation, melanin, *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance.

**CAPÍTULO 1 – PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA A DEGRADAÇÃO
DE XENOBIÓTICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS**

3 RESUMO DO CAPÍTULO 1

A água é um bem fundamental à vida na Terra e ao bem-estar social. No entanto, o acesso à água para fins diversos tem se tornado mais restrito, dadas as mudanças climáticas e a poluição de origem humana. Além dos poluentes derivados diretamente do petróleo, nas últimas décadas têm se dado mais atenção às moléculas xenobióticas, as quais não ocorrem naturalmente, mas dependem da ação humana para existir, como agrotóxicos, inseticidas, fármacos, dentre outros. Tais moléculas podem afetar os ciclos de vida de biotas que entrem em contato com essas, bem como prejudicar a saúde humana. Em colaboração com um grupo de pesquisa do Instituto de Química da UnB, buscou-se por microrganismos capazes de executar dois propósitos: degradar cafeína e/ou paracetamol, dois dos xenobióticos mais abundantes em corpos aquáticos, além de colonizar partículas de carvão feitas para a adsorção dessas moléculas. A associação de microrganismos ao carvão permitiria em tese a regeneração do sistema, prolongando o seu tempo útil de biorremediação. Foram feitos cultivos de enriquecimento utilizando água do Lago Paranoá, coletada próxima à estação de tratamento de esgoto da Asa Norte, nos quais paracetamol era a única fonte de carbono e energia disponível. Ao final da prospecção, foi obtido um isolado bacteriano, capaz de crescer em meios com cafeína ou paracetamol como fontes de carbono. No entanto, a demonstração experimental da degradação desses fármacos por técnicas de química analítica resta a ser demonstrada. Esse isolado foi identificado por PCR e métodos bioquímicos como pertencente ao gênero *Klebsiella*. Curiosamente, essa linhagem produz um pigmento marrom quando em cultivo com paracetamol. Esse pigmento foi enriquecido a partir de culturas da linhagem e teve suas propriedades físico-químicas analisadas para sua identificação. O pigmento se mostrou insolúvel para a maioria dos solventes testados; possui ampla faixa de absorção de luz no espectro ultravioleta-visível, com decaimento progressivo da absorção conforme o espectro aumenta em comprimento de onda e se mostrou altamente termoestável. Tais características são típicas de melaninas. A identificação de grupos funcionais por espectroscopia em infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) também é compatível para este tipo de molécula. A transformação de um poluente em uma melanina é de interesse biotecnológico, visto que melaninas possuem a capacidade de coordenar íons metálicos e adsorver moléculas orgânicas. Dessa forma, essa conversão pode promover uma remoção de

poluentes em uma segunda ordem, além de ser a primeira descrição de síntese de melanina obtida a partir de um precursor xenobiótico. O sequenciamento do genoma da linhagem KpV3 permitiu a identificação de genes e vias metabólicas possivelmente relacionadas à biodegradação de paracetamol, tais como a via de beta-cetoadipato e vias de degradação de xilenos, trans-cinamatos e fenilpropanoatos.

4 INTRODUÇÃO

4.1 ÁGUA E SUA PROTEÇÃO

O acesso à água é fundamental para o desenvolvimento sustentável, erradicação da pobreza, fome e para o bem-estar humano. Diretrizes tomadas em recentes tratados internacionais, como a Estrutura de Sendai para a Redução de Riscos associados a Desastres e o Acordo de Clima de Paris têm a água como um dos principais pontos (1). Desde 2015, o Fórum Econômico de Davos tem listado “crise hídrica”, entendida como um decréscimo significativo em quantidade e qualidade de água potável, dentre os cinco maiores riscos globais em termos de impacto social para os próximos dez anos (2). Em resposta às preocupações globais acerca dos riscos associados aos recursos hídricos, a assembleia geral da Organização das Nações Unidas, por meio da resolução 71/222, proclamou o período de 2018 a 2028 como a Década de Ação pela Água. Essa resolução busca fomentar a colaboração internacional em termos de ciência, pesquisa e inovação dos recursos hídricos para o desenvolvimento sustentável e estimular a execução de programas já existentes, como os dirigidos para alcançar as metas estabelecidas pelo objetivo seis dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (Garantir disponibilidade e gestão sustentável de água e saneamento para todos). A resolução visa ainda a criação de novos programas para o alcance do Objetivo seis de Desenvolvimento sustentável e sub-objetivos relacionados à gestão dos recursos hídricos (3). Outras manifestações de encontros internacionais vêm ocorrendo como uma forma de conscientizar e estimular ações acerca do uso sustentável da água.

O segundo Fórum Mundial da Água, que ocorreu no ano 2000 em Haia, definiu um conceito para a proteção da água mundial, a seguridade da água, em sua declaração ministerial (3) como:

Garantir que água doce, costal e seus ecossistemas associados sejam protegidos e melhorados; que o desenvolvimento sustentável e estabilidade política sejam promovidos, que cada pessoa tenha acesso à água limpa o suficiente por um preço acessível, de forma a levar a uma vida saudável e produtiva e que os vulneráveis sejam protegidos dos riscos relativos aos perigos à água.

Já o oitavo Fórum Mundial da água, que ocorreu no ano 2018 em Brasília, definiu dez princípios para a promoção da justiça da água, isso é, o acesso de todas as pessoas à água limpa, independente de condição financeira ou localização geográfica. Dentre esses princípios, escritos em sua Declaração de juízes ⁽⁴⁾, estão:

Princípio 1 – Água como um bem de interesse público.

O Estado deve exercitar sua administração sobre todos os recursos aquáticos, e protegê-los, em conjunção com suas funções ecológicas associadas, para o benefício de gerações atuais e futuras, e para a comunidade da vida na Terra.

Princípio 2 – Justiça da água, uso da terra e a função ecológica da propriedade.

Por causa das inter-relações próximas entre terra e água e as funções ecológicas dos recursos aquáticos, qualquer pessoa com o direito ou o interesse em usar recursos aquáticos ou terrestres tem o dever em manter as funções ecológicas e a integridade dos recursos hídricos e seus ecossistemas associados.

Sob a perspectiva brasileira, o Artigo 225 da Constituição Federal de 1988 afirma que:

Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.

O parágrafo primeiro desse mesmo artigo, inciso quinto diz ainda que o poder público deve:

Controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente.

Já a Lei 9433 de 1997, que criou a Política Nacional de Recursos Hídricos, diz em seu Artigo primeiro, incisos primeiro e segundo:

I - A água é um bem de domínio público;

II - A água é um recurso natural limitado, dotado de valor econômico;

Portanto, mesmo uma exposição breve de tratados internacionais e leis nacionais revela que existe uma preocupação de diferentes países em relação aos recursos hídricos.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que cada pessoa possa usar 7,5 litros de água por dia para fazer sua higiene. Considerando uma população de 7,5 bilhões de

peessoas, seriam necessários 150 bilhões de litros de água limpa e acessível por dia. Dessa forma, a provisão de água de forma segura não apenas é o objetivo seis de desenvolvimento sustentável da Organização das Nações Unidas (ONU), mas perpassa pelos objetivos sete (energia limpa e acessível) e doze (consumo e produção responsáveis), o que demanda consumo responsável da água e redução na poluição dos recursos aquáticos (5).

4.2 POLUIÇÃO E XENOBIÓTICOS

A noção do ser humano como agente de mudança no meio ambiente não é recente. O geólogo Antonio Stoppani, em 1873 (6), descreveu “Uma força telúrica, cujo poder e universalidade eram comparáveis com as maiores forças da terra”, ao se referir a “Era antropozoica”. Em 1926, Vernasdky (7) afirma que os processos de aumento na capacidade de pensamento do ser humano vinham ganhando cada vez mais influência sobre seu ambiente. Crutzen em 2002 (8) propõe a época geológica do “Antropoceno”, na qual os seres humanos seriam uma força crucial para a mudança geofísica na Terra. Essa época foi proposta por Crutzen com início na metade do século 18, quando foram registrados pela primeira vez aumentos nas concentrações de gás carbônico e metano em ar preso em gelo polar, bem como quando ocorreu, em 1784, o desenvolvimento do motor a vapor por James Watt. O antropoceno foi definido principalmente pelas mudanças antrópicas nas concentrações de gases da atmosfera, mas também inclui outras mudanças ambientais, como aumento no uso de solo e água potável, aumento no consumo de energia elétrica, crescimento da população humana e aumento no uso de fertilizantes. Em 2010, Dachs e Méjanelle (9) propõem de forma mais explícita também a contribuição de poluentes orgânicos, particularmente poluentes sintéticos, como fator de mudanças na biosfera durante o antropoceno.

Seres humanos sempre modificaram a composição da biosfera, ao menos desde a liberação de compostos policíclicos aromáticos com a invenção do fogo ou pelo uso de pigmentos na fabricação de produtos têxteis. Concomitantemente, ambientes costeiros, estuários e rios também estiveram sobre forte pressão antrópica, uma vez que as civilizações humanas se desenvolveram ao redor desses corpos aquáticos (9). Atualmente, em termos volumétricos, o derramamento de óleo nos oceanos ainda representa a maior fonte de poluentes orgânicos em ambientes aquáticos (10). No entanto, desde a segunda metade do

século 20, a diversidade de poluentes no meio ambiente tem aumentado significativamente, com a introdução de moléculas geradas pelas indústrias. Essas moléculas que não são sintetizadas na natureza ou cujas concentrações aumentam drasticamente no ambiente por ação antrópica são chamadas de xenobióticos (9, 11). Muitos desses xenobióticos vem sendo recentemente descritos como poluentes, assim também podendo ser chamados de poluentes emergentes (12). Os aspectos de degradação, dispersão e toxicidade desses compostos começaram a ganhar importância a partir do trabalho de Halling-Sorensen e colaboradores, apenas ao final da década de 1990, sendo assim um campo relativamente novo no estudo de poluentes (13).

Petrie e colegas (12) abordam uma série de fatores para a mudança nas concentrações de xenobióticos em corpos aquáticos. Segundo os autores, globalmente, a presença de mais de 200 xenobióticos diferentes têm sido relatada em rios e lagos. No Reino Unido, 70 xenobióticos foram encontrados em águas superficiais, dentre eles estão os Anti-inflamatórios não-esteroidais, betabloqueadores e antidepressivos. A remoção dessas moléculas dos corpos aquáticos varia conforme suas propriedades físico-químicas e degradação pelos organismos presentes no ambiente. Geralmente, essa remoção é incompleta, de forma que os xenobióticos costumam ser encontrados no ambiente em concentrações de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$. Essas concentrações podem variar drasticamente com base em muitos fatores. Alguns desses são a recalcitrância da molécula, por exemplo o ciprofloxacina, um antibacteriano que, já foi detectado em concentrações de mg.L^{-1} , em parte por conta de sua atividade antimicrobiana. Outros fatores são temporais, como é o uso da molécula pela população, uma vez que moléculas associadas a fármacos lícitos, como protetores solares, são encontradas em quantidades maiores do que as oriundas de drogas ilícitas, como cocaína. Benzolecgonina, principal metabólito da cocaína, costuma ser detectado em níveis mais elevados durante os fins de semana, assim como a presença de anti-histamínicos na água está relacionada à estação de pólen no Reino Unido. Os índices pluviométricos também afetam a concentração ambiental de moléculas de xenobióticos. Por fim, outros fatores determinam a distribuição espacial de poluentes em corpos aquáticos. A superfície desses costuma ter concentrações maiores de poluentes cuja entrada é atmosférica, como aerossóis, enquanto a coluna d'água apresenta maiores concentrações de moléculas hidrofílicas e os sedimentos costumam apresentar maiores concentrações de moléculas hidrofóbicas, de tal forma que uma distribuição homogênea de moléculas se dá apenas se o corpo aquático for raso e com alta turbulência. Já Dachs e Mejanelle (9) relatam que a fonte desses poluentes também pode variar, poluentes emergentes costumam vir a partir de fontes primárias, como indústrias e

esgoto municipal ou domiciliar, enquanto que poluentes orgânicos persistentes (POPs) podem ter como principal fonte outros ambientes naturais previamente poluídos, como solos, dada sua recalcitrância.

Embora existam diversos estudos sobre a ecotoxicidade de xenobióticos para organismos aquáticos, esses testes costumam ser feitos em laboratório e relacionando um tipo de molécula para uma espécie de organismo, de forma aguda e determinística. Dessa forma, existem testes padronizados para a determinação da toxicidade de diversos compostos. O mais comum está preconizado pelas diretrizes de testes químicos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), no qual se avalia a curva de dose resposta e dose EC50 de um determinado fármaco na inibição de movimentação de crustáceos do gênero *Daphnia* (14). Com base nesse teste, um fármaco é classificado como nocivo se a EC50 for entre 100 mg.L⁻¹ e 10 mg.L⁻¹, tóxico se a EC50 for entre 10 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ e muito tóxico se a EC50 for menor que 1 mg.L⁻¹ (Como exemplo, a figura 1). Existem ainda outros testes como ensaios de toxicidade em peixes da espécie *Danio rerio* (15). Embora esse tipo de teste seja útil para comparar a toxicidade de diversas moléculas, esses aferem a toxicidade para espécies-modelo apenas, sem levar em consideração a toxicidade em nível de comunidades de organismos ou potenciais sinergismos de toxicidade entre moléculas (12). Esse tipo de ensaio também é mais adequado para a medição de toxicidade aguda de moléculas, a qual depende de concentrações relativamente altas no ambiente, em contraste com a toxicidade de exposição crônica, porém em concentrações menores (16). Um dos fatores que tornou o estudo de poluentes xenobióticos um assunto recente é a concentração desses no ambiente e sua diversidade de moléculas, de forma que muitos poluentes podem não ser analisados em um dado estudo de ocorrência ou toxicidade porque ocorrem em concentrações indetectáveis metodologicamente ou possuem estrutura tal que não existem métodos para sua análise, o que predispõe tais estudos para a análise de um ou poucos poluentes, representativos em sua dispersão ou toxicidade de uma classe de poluentes, e em concentrações altas. Uma alternativa a esses estudos é o fracionamento de poluentes *in loco* e sua testagem sobre organismos, mas ainda são necessários avanços em técnicas analíticas para uma compreensão mais realista sobre a presença e efeito de poluentes sobre organismos (9).

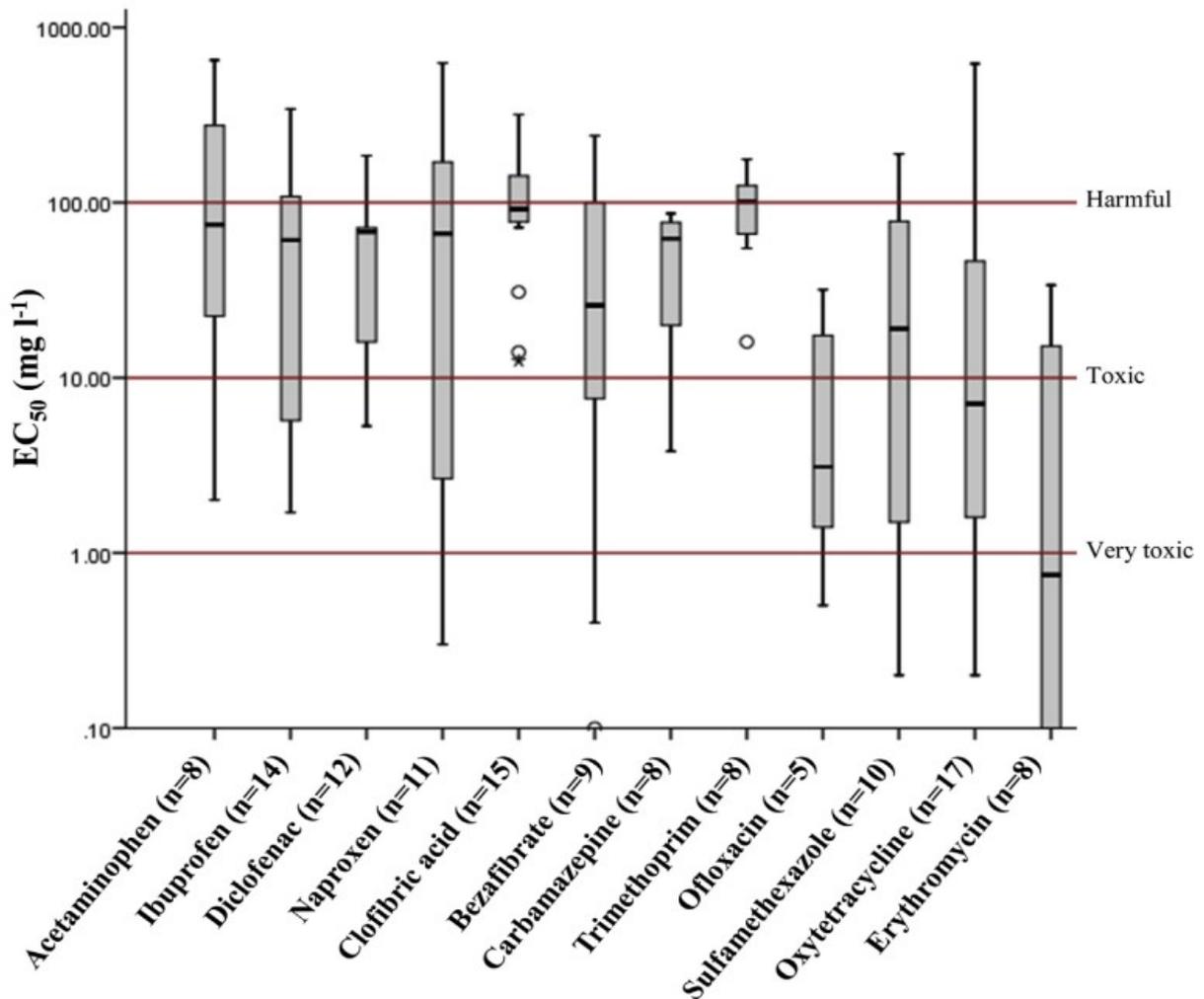


Figura 1. Toxicidade comparativa de diferentes xenobióticos. A comparação se dá com base no teste de EC₅₀ de mobilidade de *Daphnia*. Retirado de Patrie *et al*, 2015.

4.3 CAFEÍNA E PARACETAMOL

Os fármacos paracetamol e cafeína são tidos como de toxicidade baixa, por isso atualmente não são inclusos nas diretrizes atuais de vigilância da União Europeia. Nunes e colaboradores (17) observaram que ensaios de toxicidade de paracetamol para diferentes organismos aquáticos mostraram doses de tóxicas EC₅₀ menores para crustáceos, como do gênero *Daphnia* (Entre 5,0 a 70,0 mg.L⁻¹), doses intermediárias para bactérias como do gênero *Vibrio* (Entre 70,0 a 120,0 mg.L⁻¹) e a cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Entre 170,0 a 215 mg.L⁻¹) e doses altas para plantas, como a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

(Entre 350 a 550,0 mg.L⁻¹) e macrófitas do gênero *Lemna* (Toxicidade não observada para doses menores que 1.000,0 mg.L⁻¹). No entanto, a dose EC50 teve ampla variedade mesmo ao se comparar organismos do mesmo gênero, da ordem de dez vezes ou mais. De acordo com os autores, a metabolização intracelular de paracetamol pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez poderia levar a danos em polímeros de ácidos nucleicos (DNA e RNA), oxidação de membranas lipídicas e desnaturação de proteínas. Ainda de acordo com os autores, paracetamol possui semelhanças estruturais com disruptores endócrinos de crustáceos, o que poderia interferir com a muda desses e ajudar a explicar porquê esse grupo de organismos foi mais sensível à presença do fármaco. De todo modo, essa variedade na toxicidade para diferentes organismos torna difícil a previsão do impacto ecotoxicológico desses fármacos em rios e lagos. No entanto, de Voogt e colaboradores (18) classificam paracetamol como um fármaco de controle prioritário em manejo de água, por conta de seu consumo elevado por humanos, toxicidade, ocorrência em rios e lagos e sua persistência.

Embora o estudo de contaminantes emergentes em corpos aquáticos tenha se intensificado a partir dos anos 2000, existem relatos para a presença de cafeína como poluente destes desde 1968 (19), de forma que esse poluente é um dos que mais possui registros em número de estudos, em anos analisados e ensaios de toxicidade descritos para organismos aquáticos (20). Em uma meta-análise de 522 estudos, Rodríguez-Gil e colaboradores (20) estimaram a concentração de cafeína encontrada globalmente em diferentes corpos aquáticos (figura 2). Além destes dados, também foi encontrado um artigo no qual foram determinadas as concentrações de cafeína em água de chuva na Itália (21). De acordo com os autores, dada a distribuição de casos de detecção de cafeína em corpos aquáticos, esse poluente é ubíquo no planeta. Ainda para entender como esse poluente é distribuído no mundo, foram feitas análises probabilísticas para a presença de cafeína em diferentes regiões geográficas (figura 2). Os autores notam que há uma sobreposição nos valores de concentração de cafeína para influente e efluente de esgoto na região da América do Sul, o que segundo eles, poderia ser um indicativo de que podem ser necessárias melhorias nos sistemas de tratamento de esgoto dessa região para a remoção desse fármaco. Ainda, dentre os dez estudos analisados por estes autores com maiores concentrações de cafeína para águas superficiais, quatro são de estudos brasileiros.

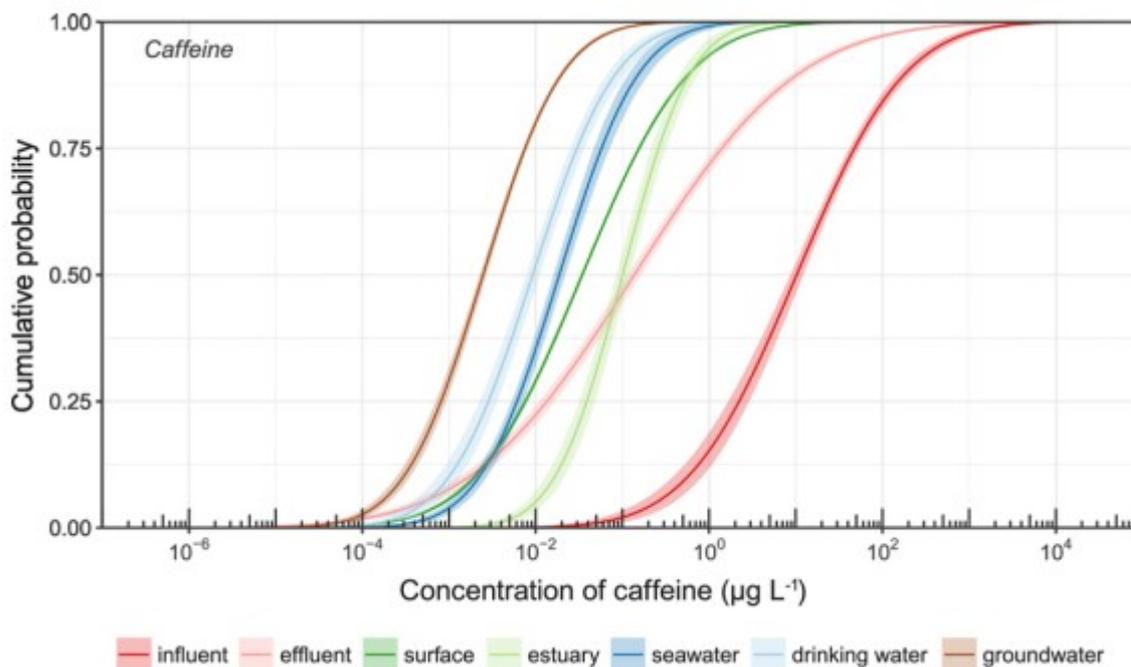


Figura 2: Curvas de probabilidade de exposição ambiental de cafeína por estudo analisado em meta-análise. Os ambientes aquáticos de Influyente de esgoto, efluente de esgoto, águas superficiais, águas estuarinas, água de oceanos, água potável e águas subterrâneas estão representados. A área ao redor das curvas representa o intervalo de confiança de 95% para as distribuições. Modificado de Rodríguez-Gil *et al*, 2018

Além disso, em uma revisão bibliográfica contendo estudos de 2012 a 2017, Sousa e colaboradores (16) observaram que essas moléculas estão dentre as encontradas em maiores concentrações em corpos aquáticos pelo mundo (figura 3). Essas concentrações se devem ao despejo relativamente constante e elevado dessas moléculas em corpos aquáticos; seja pelo consumo da cafeína em cafês, chás, chocolates e medicamentos (22); seja pelo uso elevado de paracetamol como fármaco, com ou sem prescrição (23), ambos sendo liberados inalterados para os sistemas de tratamento de esgoto por meio da urina dos consumidores. Fármacos como os supracitados podem ainda ter contribuições a sua concentração em corpos aquáticos por meio de seu uso medicamentoso para animais domésticos e em efluentes industriais (17). Uma vez que o despejo dessas moléculas faz com que suas concentrações sejam altas constantemente em rios e lagos, sendo assim denominados pseudo-persistentes, estas podem representar potenciais fontes de toxicidade crônica em ecossistemas aquáticos (16).

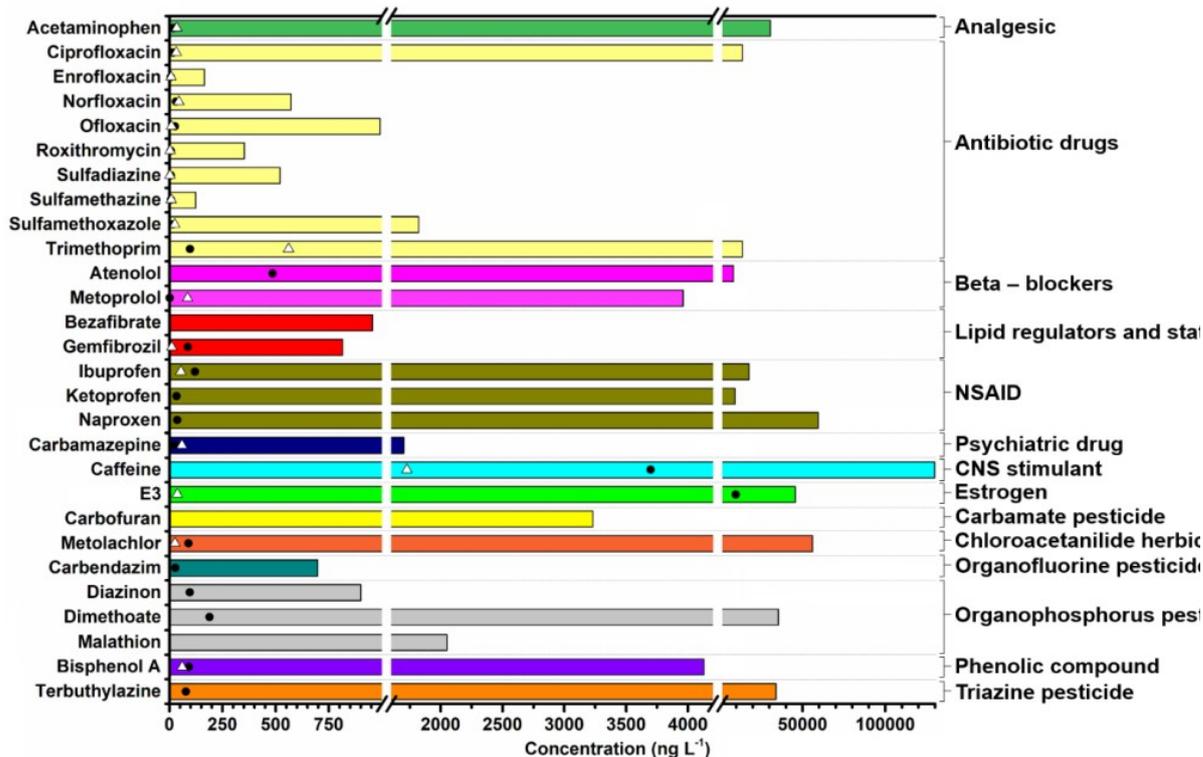


Figura 3. Concentração de Moléculas poluentes não-monitoradas pela legislação europeia, mas para as quais existem ao menos dez estudos entre 2012 e 2017. Os círculos negros representam a média das concentrações encontradas nos artigos e os triângulos brancos, a mediana. Retirado de Sousa *et al*, 2017.

4.4 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação, se concebida como o uso de organismos vivos para a degradação de dejetos, vem sendo utilizada inconscientemente desde o início das civilizações humanas, quando essas precisavam se livrar de seu lixo. Muitas vezes sem saber da presença dos microrganismos, os seres humanos vêm dependendo destes para a degradação de rejeitos domésticos, da agricultura e da indústria. Todavia, nos últimos séculos, o uso de microrganismos tem se tornado menos intuitivo e mais afeito ao conhecimento técnico, científico e à engenharia (24). Desde meados do século XIX na Inglaterra, filtros baseados em bancos de areia vêm sendo usados para a remoção de turbidez e poluentes biológicos, como protistas e vírus, com a participação de bactérias em sua superfície. Estes filtros têm sido aplicados desde 1892 na Alemanha e desde a década de 1930 na China (25). Ainda em 1930,

Tausz e Donath (26) propõem o uso de bactérias para a degradação de moléculas derivadas de petróleo, como hexano, heptano e decano. Já a primeira aplicação da biorremediação como ciência em um local poluído foi feita por Raymond e colegas em 1975 (27), os quais observaram que a adição de nutrientes em solos contaminados com petróleo permitia o aumento no número de bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos e, portanto, permitia um aumento na degradação dos poluentes derivados do petróleo. Atualmente, sabe-se que microrganismos possuem ampla distribuição em habitats do planeta, como consequência possuem ampla diversidade metabólica, além de participarem de processos de fixação de carbono, fixação de nitrogênio e contribuírem para geração e consumo de metano e compostos sulfurados, sendo parte importante dos ciclos geoquímicos globais (10). Ao considerar essas características, fica evidente o potencial no uso de microrganismos para a biorremediação.

Na despoluição aquática, particularmente para água potável, o uso de agentes biológicos possui uma série de vantagens sobre tratamentos exclusivamente químicos ou físicos, tais como serem de possível utilização para uma ampla diversidade de poluentes; são menos custosos e requerem menos energia; podem ser utilizados de forma robusta em várias condições operacionais de tratamento e tipicamente causam a mineralização completa de poluentes não-metálicos, isso é, promovem a conversão desses poluentes em seus constituintes inorgânicos fundamentais, como H_2O e CO_2 (5).

Garbisu *et al* (2017) (28) classificam as estratégias de biorremediação de compostos orgânicos como bioatenuação, bioestimulação e bioaumento. Esse último poderia ser subdividido entre bioaumento celular e bioaumento genético. Na bioatenuação, nenhuma intervenção humana é feita sobre o ambiente afetado, de forma que os microrganismos nativos despoluam o ambiente naturalmente. Nessa estratégia, a intervenção humana está limitada a monitorar parâmetros do ambiente afetado relacionados à poluição, como pH, medidas de turbidez aquática, dentre outros. Na bioestimulação, condições abióticas do ambiente são modificadas, como temperatura, umidade, pH, dentre outros ou são inseridas fontes de carbono ou nitrogênio ou ainda aceptores de elétrons para microrganismos nativos se encontrarem em condições favoráveis para a remoção do poluente, ou seja, são feitas modificações no ambiente de forma a se estimular a degradação do poluente por populações ou comunidades nativas de microrganismos. Já no bioaumento, informação exógena ao ambiente é introduzida nesse para a remoção do poluente. Isso pode se dar pelo bioaumento celular, onde microrganismos exógenos capazes de degradar ou imobilizar o poluente são introduzidos no ambiente. E também pode ser feito por meio do bioaumento genético, onde

microrganismos exógenos são introduzidos no ambiente para transmitir genes relacionados à remoção do poluente para microrganismos nativos, geralmente por conjugação plasmidial. Enzimas exógenas, como peroxidases, laccases e tirosinases ainda podem ser alternativas para a biorremediação, em sistemas livres de células (29). Também podem ser implementadas as chamadas células de combustível microbianas (Em inglês, Microbial fuel cells), onde um cátodo e um ânodo são introduzidos no sistema de biorremediação de forma a conferir elétrons necessários para a biorremediação dos microrganismos circundantes, pelo cátodo, ou remover elétrons gerados a partir desta atividade, pelo ânodo. De todo modo, há a geração de corrente elétrica, que pode ser um subproduto benéfico do processo. Há também as células de eletrólise microbiana, onde é fornecida energia pelo cátodo, necessária para a conversão de uma molécula recalcitrante à biorremediação em um produto passível de mineralização pela microbiota presente. Ambas as células de combustível microbiana e de eletrólise microbiana podem ser utilizadas para acelerar a cinética de degradação de um dado poluente, sem necessitar da introdução de moléculas exógenas como fontes de elétrons, como ocorre na bioestimulação (30) (Figura 4).

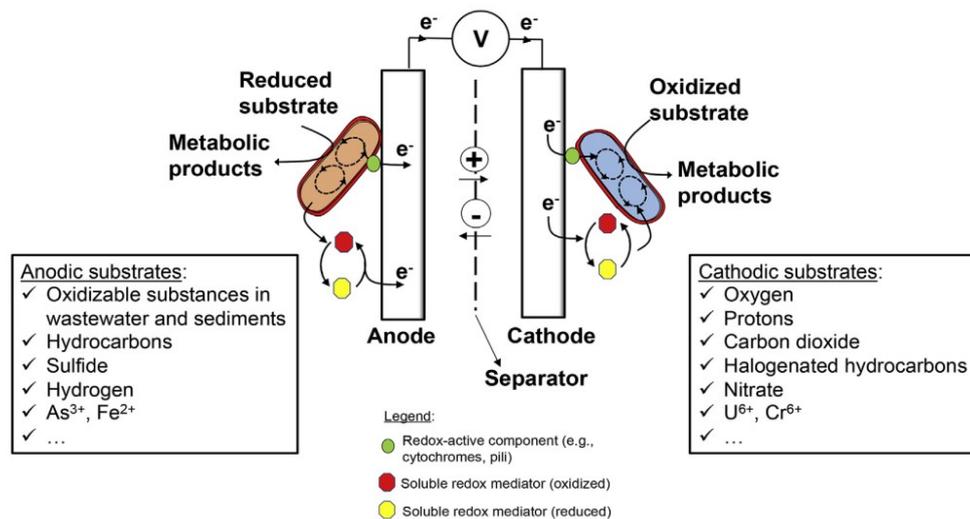


Figura 4. Esquema geral de funcionamento de uma célula de combustível microbiana. No ânodo, podem ser coletados elétrons vindos da oxidação de um composto de interesse por microrganismos, sejam esses compostos de natureza mineral ou orgânica. Estes elétrons podem ser transferidos ao ânodo por sistemas redox dos microrganismos ou por mediadores solúveis. No cátodo, o contrário acontece, são expelidos elétrons que podem ser utilizados por microrganismos para reduzir compostos de interesse, esses sendo minerais ou orgânicos. Retirado de Wang *et al*, 2020

Como um breve adendo, até sistemas de corrente elétrica separados espacialmente em cátodo e ânodo não foram invenções originais dos seres humanos. As ditas bactérias de cabo (*cable bacteria*) conseguem formar cabos multicelulares através de centímetros em substratos marinhos, conectando reações de oxidação de sulfeto de hidrogênio (ânodo) a reações de redução de oxigênio (cátodo) (31) (Figura 5).

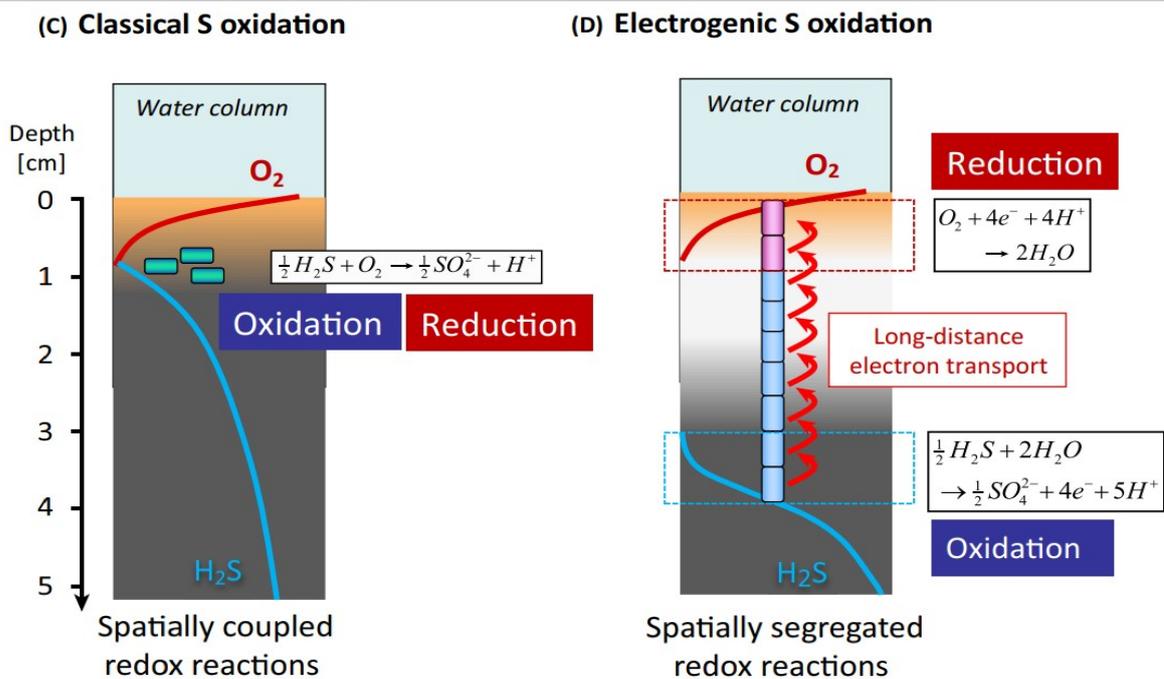


Figura 5. Oxidação clássica de sulfeto de hidrogênio por microrganismos terrestres versus oxidação eletrogênica. Em reações clássicas de oxidação de enxofre, tanto moléculas contendo enxofre, como H₂S, são oxidadas quanto gás O₂ é reduzido por uma mesma população bacteriana. Na oxidação eletrogênica, bactérias em camadas anóxicas oxidam moléculas com enxofre e carregam elétrons por cabos bacterianos até as bactérias na superfície, o que permite usar camadas mais profundas de substrato para obtenção de energia.

Para a introdução de microrganismos exógenos em um ambiente a fim de se propiciar biorremediação, esses podem ser introduzidos como células livres, sistemas de aprisionamento em uma matriz ou de adsorção sobre uma superfície carreadora, sendo esses sistemas detalhados por Lin e colegas (2010) (32). Ao se introduzir microrganismos em associação com algum sistema de transporte, em vez de células livres, é possível se obter maior tolerância dos microrganismos contra a toxicidade do poluente, bem como se ter maior controle da dispersão desses no ambiente e de proteger os microrganismos contra outros fatores prejudiciais, como predadores e demais toxinas do sistema. Nas estratégias de

aprisionamento, os microrganismos são contidos dentro de matrizes, podendo ser de carboidratos como alginato; ágar; goma gelana; dentre outros ou sintéticos como álcool polivinílico. Já nas estratégias de adsorção, podem ser usadas diversas superfícies, contanto que essas sejam colonizáveis pelo microrganismo em questão, como compostos silicados, cerâmicas e carvões. Enquanto as estratégias de aprisionamento proporcionam maior contenção dos microrganismos no ambiente, essas estratégias também oferecem mais estresse para o crescimento dos microrganismos, em relação às estratégias de adsorção. Dentre os carreadores por adsorção, aqueles feitos a partir de carvões tem sido descritos para a biorremediação de poluentes poliaromáticos de petróleo (33, 34) e poluentes sintéticos, como piridina (32) e cipermetrina (35), dentre outros. Enquanto a superfície carbonácea pode adsorver diretamente os poluentes do ambiente, ela também pode carrear microrganismos exógenos para a biodegradação desses (bioaumento) e propiciar condições mais favoráveis para a microbiota nativa também degradar o poluente, como fontes de carbono e nitrogênio (bioestimulação) (34). Um colega do instituto de química, Carlos Cardoso, desenvolveu partículas de carvão, a partir da pirólise de cascas de jatobá, capazes de adsorver cafeína e paracetamol. Ele nos procurou para prospectar microrganismos que fossem capazes de colonizar essas partículas e contribuir para a degradação desses fármacos. Como colaboração, ele gostaria de aplicar microrganismos capazes de colonizar a superfície de carvão e degradar os xenobióticos. Dessa forma, o consumo dos xenobióticos pelas bactérias aderidas às partículas de carvão poderia levar à regeneração da capacidade adsorptiva deste, tornando o sistema mais sustentável a longo prazo. Portanto, a motivação original para o presente trabalho foi a prospecção de microrganismos capazes destas funções.

Além das estratégias de biorremediação, algumas técnicas para a prospecção de microrganismos de interesse se tornaram características da área, como discutido por Haiser e Turnbaugh (36). Dentre elas está o *Isotope probing*, no qual a molécula a ser degradada é marcada com isótopos de carbono e se monitora no ambiente quais microrganismos incorporam esses isótopos em suas moléculas de DNA, RNA ou ácidos graxos. A molécula a ser degradada também pode ser utilizada como única fonte de carbono e/ou nitrogênio e/ou único acceptor final de elétrons em meios de cultura, de forma que a degradação desse composto se torna condição *sine qua non* para o crescimento do microrganismo. Essa estratégia é conhecida como enriquecimento seletivo de microrganismos. Também é possível construir bibliotecas metagenômicas de microrganismos de um dado ambiente em células hospedeiras, tais como *Escherichia coli*, e as colônias resultantes podem ser prospectadas pela atividade de biorremediação de interesse, em vez de se prospectar pelos microrganismos do

ambiente diretamente. Essa técnica recebe o nome de metagenômica funcional. Finalmente, existe a técnica *substrate induced gene expression* (SIGEX). Nessa, aproveita-se o fato que genes relacionados ao catabolismo de moléculas orgânicas comumente tem sua expressão induzida pela presença dessas. Assim, são construídas bibliotecas genômicas plasmídeos de expressão de GFP, de forma que se buscam sequências promotoras da expressão deste gene. Em seguida, as colônias resultantes são expostas à molécula de interesse e as células fluorescentes são analisadas.

Até o presente, a biodegradação de paracetamol (acetaminofeno ou N-acetil-p-aminofenol) por microrganismos é pouco conhecida, por conta dos trabalhos que descrevem essa atividade o fazerem exclusivamente por métodos de química analítica, como HPLC/MS. O que se sabe (figura 6) é que a forma de degradação mais observada é a conversão de paracetamol em 4-aminofenol, esse sendo um agente mutagênico e comumente não é catabolizado posteriormente por microrganismos. Em condições nas quais 4-aminofenol foi degradado, esse era transformado em hidroquinona. Na maioria dos estudos, a hidroquinona tem seu anel aromático rompido, provavelmente por uma dioxigenase, em 4-hidroximucônico semialdeído. Foram também descritas alternativas para a degradação de hidroquinona em ácido hexa-3-enedióico, hidroxiquinol ou 4-metoxífenol, sendo que 4-hidroximucônico semialdeído e hidroxiquinol podem ser convertidos em ácido maleiacético. Existe ainda a degradação por metilação de paracetamol em p-acetonisídeo, hidroxilação de paracetamol em 3-hidroxiacetaminofeno e a conversão de paracetamol em catecol, por passos reacionais desconhecidos (23).

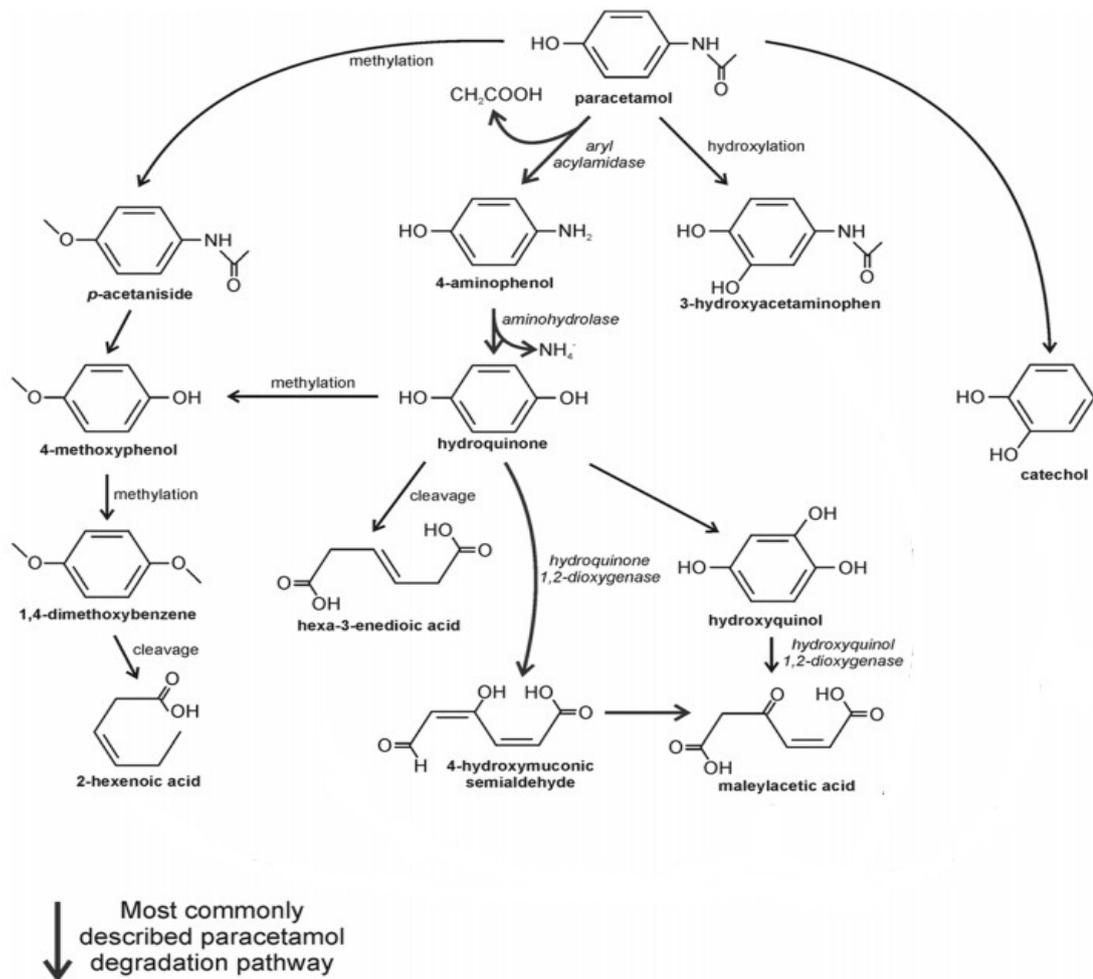


Figura 6. Vias metabólicas para a biorremediação de paracetamol por microrganismos. As setas em negrito representam os passos reacionais encontrados mais comumente em diferentes estudos. Modificado de Žur *et al*, 2018.

Até a década de 1970, a biodegradação de cafeína não era estudada, pois existiam relatos da capacidade antimicrobiana da molécula isolada ou em associação com outros antimicrobianos (37). Até que em 1971, Kurtzman e Schwimmer demonstram essa biodegradação por microrganismos (38).

Desde então, em bactérias, três vias metabólicas estão descritas para o catabolismo de cafeína (1,3,7-trimetilxantina). Essas vias são a N-demetilação (figura 7), via de oxidação C-8 (figura 8) e uma via onde metabólitos intermediários da N-demetilação sofrem oxidação em C-8 (figura 9) (22, 37). Em todas as vias, as bactérias são capazes de mineralizar cafeína em gás carbônico e amônia, de forma a obter energia, carbono e nitrogênio. A partir de cada demetilação, com o uso também de oxigênio molecular como substrato reacional, são gerados como produtos um aldeído e uma molécula de água (22).

Na via de N-demetilação, como o nome sugere, grupos metil ligados a nitrogênio da molécula são removidos sucessivamente. Essa via aparenta ser a principal via utilizada por microrganismos para degradação de cafeína e é a melhor caracterizada em termos de enzimas envolvidas. A principal via de N-demetilação, ao menos em *Pseudomonas putida* CBB5, se dá pela remoção de metil nas posições 1, gerando teobromina e em seguida 3, gerando 7-metilxantina, a qual é demetilada em xantina. Essa última pode ser degradada por meio da via catabólica das purinas. De forma alternativa, o metil da posição 5 pode ser removido primeiro a partir da cafeína, gerando paraxantina. Essa então é demetilada em sua posição 3, gerando 7-metilxantina. Para a cepa de *P. putida* CBB5, a proteína NdmA possui atividade monoxigenase e remove o metil do nitrogênio 1 e a proteína NdmB também possui atividade monoxigenase e remove o metil do nitrogênio 3. Para a ação dessas enzimas, uma redutase, NdmD, que promove o transporte de elétrons de NADH para a reação. Para a demetilação do nitrogênio 7, um complexo proteico, chamado NdmCDE, é empregado. Nesse complexo, NdmC possui atividade monoxigenase, porém, ao contrário de NdmA e NdmB, não possui cluster férrico para atração do oxigênio, de forma que NdmE funciona como uma proteína adaptadora entre NdmC e NdmD. Os genes correlatos a essas enzimas, ao menos nessa cepa, se encontram em um grupo relativamente pequeno de 14 kb. Nesse cluster, encontra-se também o gene *frmA*, que codifica uma enzima formaldeído desidrogenase, sendo, portanto, capaz de reduzir NAD a NADH, o que dá continuidade à reação, e desprotonar formaldeído em ácido fórmico, de tal forma que os prótons podem ser usados para o metabolismo energético da célula (22).

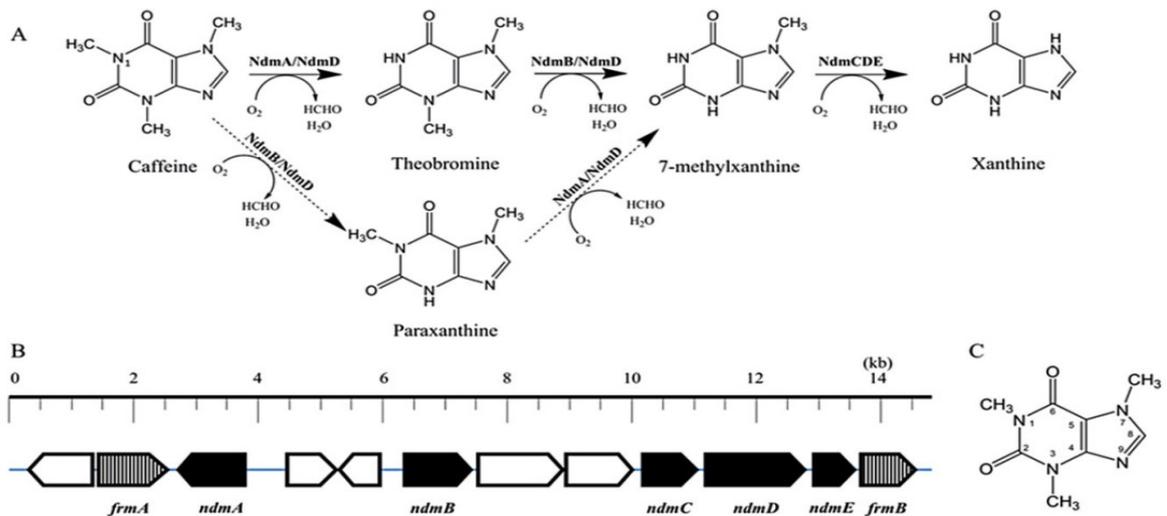


Figura 7. Via de N-demetilação da cafeína em *P. putida* CBB5. A- Metabólitos intermediários da via, com suas reações e enzimas respectivos. B-Grupo gênico contendo os genes responsáveis pela reação. C- Numeração dos átomos da molécula de cafeína. Retirado de Summers *et al.*, 2015.

Já a via de oxidação C8, como o nome sugere, se inicia a partir da oxidação do carbono 8 da cafeína, de forma a gerar ácido 1,3,7 trimetilúrico. Essa molécula é reduzida em ácido 1,3,7-trimetil-5-hidroxiúrico e esta é clivada em 3,6,8-trimetil-2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolino. Por fim, essa última molécula é decarboxilada em 3,6,8-trimetil-alantoína. A partir desse passo da reação, não existe validação dos passos reacionais com enzimas isoladas, mas especula-se que esta molécula é convertida em ácido 3,6,8-trimetil-alantóico. Por fim, essa molécula seria metabolizada após diversos passos em ácido glicóxico, monometiluréia e dimetiluréia. Essas moléculas então poderiam entrar em vias centrais do metabolismo, como ciclo da ureia e ciclo do ácido glicóxico. Para a cepa de *Pseudomonas* sp. CBB1, por meio de busca em banco de dados *protein* do NCBI por xBLAST, vários genes puderam ser sugeridos como participantes da via. Porém, apenas algumas enzimas da via foram isoladas e caracterizadas, como o heterotrímero Cdh, que cataliza a oxidação da cafeína e a monooxigenase TmuM, que catalisa a reação seguinte da via (22).

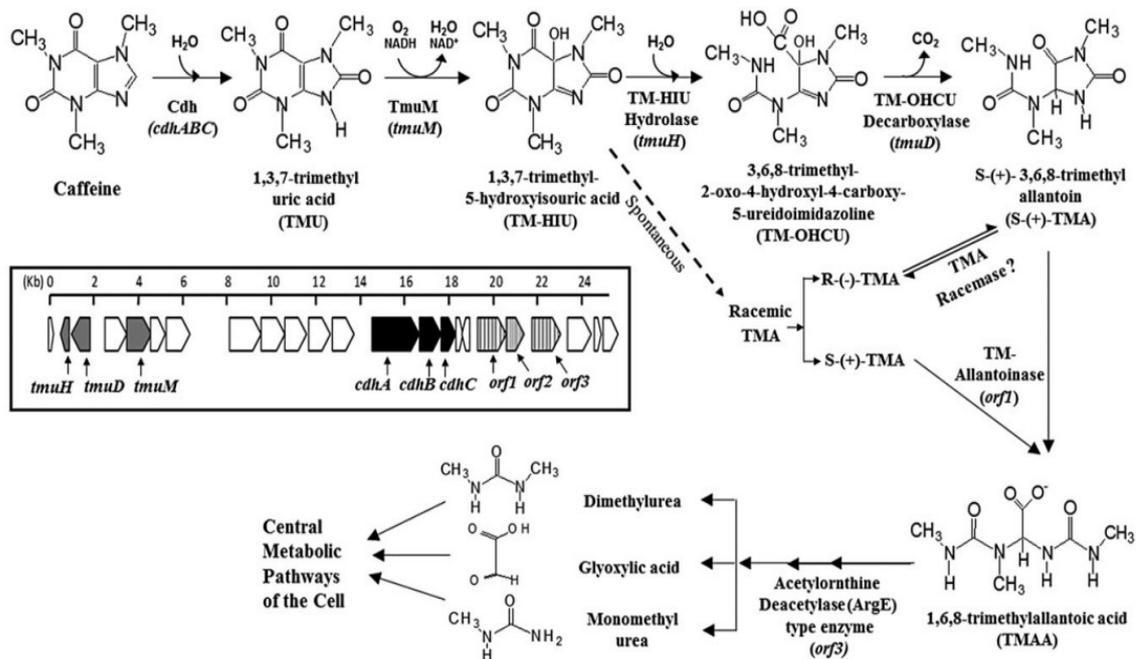


Figura 8. Via de oxidação em C8 de cafeína proposta para *Pseudomonas* sp. CBB1. Essa via se dá com a oxidação em carbono 8 da cafeína, seguida de redução e clivagem do anel hexamérico por hidrolase. Após decarboxilação da molécula resultante, a via converge para a via de degradação de nucleotídeos, uma vez que os intermediários reacionais a partir desse ponto são formas modificadas de alantoína. Por fim, a degradação resulta em moléculas pequenas como ácido glicóxico e formas alternativas de ureia, as quais são assimiladas por vias centrais de metabolismo carbônico da célula Retirado de Summers *et al.*, 2015.

Por fim, metabólitos da via de N-demetilação, como teobromina, paraxantina, e xantina podem sofrer oxidação em C8. Ocorrendo nessa última molécula, a via pode convergir para degradação em alantoína e, por fim, em ácido glicóxico e ureia, de forma similar à via de oxidação em C8, embora não estejam claros quais genes possam estar associados a essa confluência de vias (22,37).

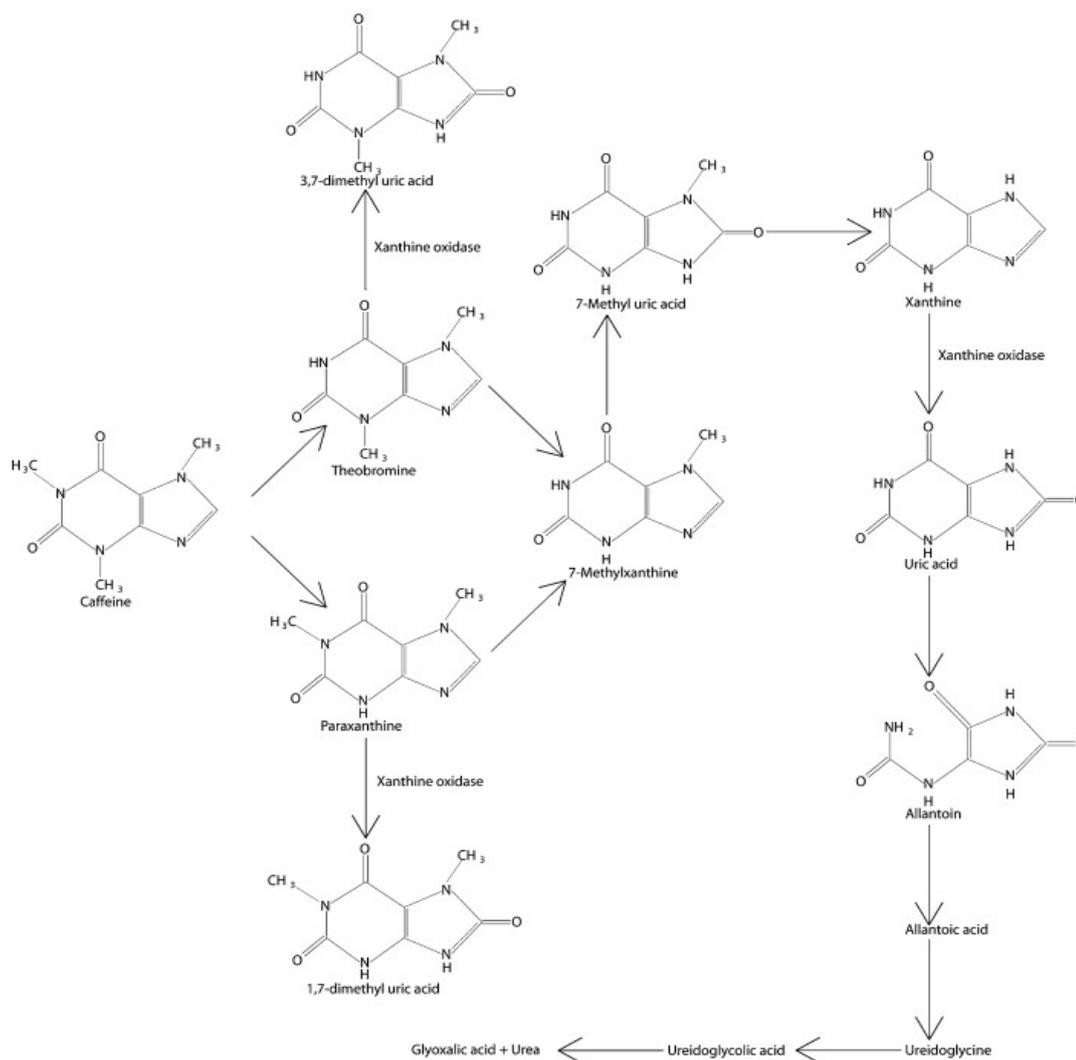


Figura 9. Oxidação em C8 de metabólitos oriundos da via de demetilação. O início da via de demetilação tem a maioria de seus intermediários reacionais convergindo para ácido 7-metilúrico, o qual pode ser convertido em alantoína e convergir para a via de catabolismo de nucleotídeos. Retirado de Gummadi *et al*, 2012.

Dentre as bactérias capazes de degradar paracetamol, encontram-se espécies do gênero *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa* e *P. moorei*, além de *Stenotrophomonas* e as espécies *Delfia tsuruhatensis* e *Rhodococcus ruber* (23). Já em relação à cafeína, a maioria dos relatos é de *Pseudomonas*, particularmente *P. putida*, com outras espécies descritas raramente (22) (tabela 1).

Tabela 1. Cepas bacterianas relatadas na literatura científica capazes de degradar cafeína, seus locais de isolamento e suas vias de degradação.

Organism	Location isolated	Catabolic pathway
<i>Pseudomonas putida</i> strain 40	California, USA	N-demethylation
<i>Pseudomonas putida</i> C1	Germany	N-demethylation
<i>Pseudomonas putida</i> C3024	Netherlands	N.R.
<i>Pseudomonas putida</i> WS	Germany	N-demethylation
<i>Pseudomonas</i> sp. No. 6	Japan	N-demethylation
<i>Pseudomonas putida</i> No. 352	Japan	N-demethylation
<i>Serratia marcescens</i>	Brazil	N-demethylation
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 700097	California, USA	N-demethylation
<i>Klebsiella</i> and <i>Rhodococcus</i>	India	C-8 oxidation
<i>Pseudomonas putida</i> (8 strains)	Brazil	N.R.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Brazil	N.R.
Coryneform (4 strains)	Brazil	N.R.
<i>Acinetobacter</i> sp. (3 strains)	Brazil	N.R.
<i>Flavobacterium</i> sp. (2 strains)	Brazil	N.R.
<i>Moraxella</i> sp.	Brazil	N.R.
<i>Pseudomonas putida</i> IF-3	Japan	N-demethylation
<i>Pseudomonas putida</i> L	Brazil	N-demethylation
<i>Pseudomonas putida</i> KD6	N.R.	N-demethylation
<i>Alcaligenes</i> sp.	Canada	C-8 oxidation
<i>Pseudomonas putida</i> NCIM 5235	India	N-demethylation
<i>Pseudomonas</i> sp. CBB1	Iowa, USA	C8-oxidation
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> CFR 1708	India	N.R.
<i>Alcaligenes fecalis</i> T1	India	N.R.
<i>Acetobacter</i> sp. T3	India	N.R.
<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	Iowa, USA	N-demethylation
<i>Pseudomonas</i> sp. CES	Iowa, USA	N-demethylation

N,R significa "não-relatado". Retirado de Summers *et al*, 2015.

5 JUSTIFICATIVA

Dada a alta prevalência de paracetamol e cafeína em corpos aquáticos como decorrência de poluição antrópica, torna-se necessário o melhor conhecimento acerca de como esses fármacos podem ser biodegradados do meio ambiente, visando aplicações biotecnológicas para tal.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

-Isolar e caracterizar microrganismos do Lago Paranoá capazes de biodegradar cafeína e/ou paracetamol e colonização sobre partículas de carvão para o desenvolvimento de um sistema de remoção destes poluentes em ambientes aquáticos.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Isolar e cultivar microrganismos do Lago Paranoá capazes de utilizar paracetamol ou cafeína como fontes únicas de carbono e energia em meio mínimo de sais;

-Identificar em nível de espécie o isolado microbiano, com base em técnicas bioquímicas e moleculares, como genômica;

-Caracterizar o potencial de colonização do isolado microbiano sobre as partículas de carvão desenvolvidas no LMC/IQ;

-Identificar os metabólitos intermediários da degradação dos xenobióticos por meio de técnicas de química analítica, como HPLC-MS ou RMN;

-Identificar genes possivelmente relacionados à biodegradação dos xenobióticos por análises genômicas;

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Foram coletados aproximadamente 50 mL de água do lago Paranoá, nas coordenadas geográficas 15,740962S e 47,881235O. A partir desse volume, foi inoculado 1 mL em profundidade e 50 µL em superfície em placas de petri contendo meio mínimo de sais M9 (90,0 mM Na₂SO₄; 22,0 mM KH₂SO₄; 18,0 mM NH₄Cl; 2,0 mM MgSO₄; 0,1 mM CaCl₂; 15 g.L⁻¹ ágar) suplementado com 3,3 mM (0,5 g.L⁻¹) de Paracetamol. Essas placas foram incubadas por 24h a 25°C. A partir do crescimento dessas placas, seis colônias de cada placa foram repicadas em 5 mL de meio M9 líquido suplementado com 3,3 mM de Paracetamol. Essas amostras foram incubadas por 72 h a 25°C e 180 RPM de agitação em shaker (6430B, Thoth equipamentos). A partir do crescimento de microrganismos em duas amostras, foi feito inóculo em esgotamento em placas de meio M9 suplementado com 3,3 mM de Paracetamol, as quais foram incubadas por 24 h a 25°C, para obtenção de culturas puros. Três colônias de cada placa (A1, A2, A3, V1, V2 e V3) foram cultivadas em 5 mL de meio M9 líquido suplementado com 3,3 mM paracetamol por 24 h a 25°C e então estocadas em solução de 25% (v/v) de glicerol a -80°C. Os experimentos seguintes foram feitos com o isolado da placa V3, o qual é referido ao longo do texto como KpV3.

7.2 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE CODIFICADOR DO RRNA 16S POR PCR, SEQUENCIAMENTO E BUSCA EM BANCO DE DADOS.

O DNA genômico do isolado foi obtido a partir do kit de extração Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante a partir de culturas em meio LB. A qualidade da extração foi observada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) com brometo de etídio em concentração de 0,5 µg.mL⁻¹ e tampão SB (10 mM NaOH, 36 mM H₃BO₃). Em seguida, foi feita reação de PCR contendo tampão de reação (20 mM Tris-Hcl, 50 mM Kcl, pH 8,4) (Ludwig Biotecnologia Ltda), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM

dNTPs (Ludwig Biotecnologia Ltda), 0,5 U de TaqDNA polimerase (Ludwig Biotecnologia Ltda) e 0,2 μ M dos iniciadores senso RW01 (5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3') e antisenso DG74 (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'), descritos em Greisen *et al*, 1994 (39).

O programa utilizado para as reações foi:

95°C – 4 minutos	} 30x
95°C – 30 segundos	
X°C – 30 segundos	
72°C – 30 segundos	
72°C – 5 minutos	
12°C – <i>ad infinitum</i>	

Onde X representa um gradiente de temperaturas de 50°C a 65°C (50,0°C; 53,9°C; 56,0°C; 58,5°C; 62,4°C; 65,0°C).

A reação foi feita em termociclador do modelo LifeTouch (Bioer). A observação das ampliações foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose, como foi feito após a extração de DNA genômico. Após a obtenção dos amplicons desejados, as amostras oriundas das reações de PCR foram quantificadas em aparelho nanodrop (Nanodrop lite, Thermo Scientific). Em seguida, foram feitas soluções contendo 10 ng dos amplicons e 0,2 μ M de um dos primers (RW01f ou RW01r), em um volume final de 7 μ L. Essas soluções foram enviadas para sequenciamento no Centro de Genômica de Alto Desempenho do DF, na Universidade Católica de Brasília, em aparelho Sequence Scanner (Applied Biosystems). Para análise do sequenciamento, foi utilizado o software Chromas (disponível para download em <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>). A partir desse software, foi obtida uma sequência em formato FASTA para cada sequenciamento e essa foi comparada com outras sequências de DNA depositadas no banco Nucleotide do site NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) por meio do software nBLAST, usado em parâmetros padrão.

7.3 SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA BACTERIANO

O DNA genômico foi extraído seguindo o mesmo protocolo para extração de DNA antes da PCR (seção 6.9). A integridade do genoma extraído foi verificada por eletroforese em

gel de agarose a 1% e quantificação por Nanodrop Lite™ (Thermofisher). A biblioteca de DNA foi preparada por meio do kit de sequenciamento rápido (RAD004) da Oxford Nanopore, conforme instruções do fabricante. O sequenciamento foi feito em *flowcell* R9.4.1 por 24h, em um dispositivo MinION. A chamada de bases (*basecall*) foi feita usando programa Guppy 4.4.2. O genoma foi montado de novo com Flye (40), com o pipeline MpGAP(<https://github.com/fmalmeida/MpGAP>), com parâmetros padrão. O polimento do genoma foi feito com os programas Medaka (<https://github.com/nanoporetech/medaka>), com o modelo *r941_min_high_g344*, e Homopolish (41), com os parâmetros para “flowcell R9.4” e “bactéria”. A completude do genoma foi avaliada com o programa BUSCO V4.1.0 (42), usando o banco de dados “enterobacteriales_odb10”. A identificação do isolado foi feita por meio de análise ANI com o programa fastANI (43), contra os genomas do gênero *Klebsiella* depositados no banco Genbank. A anotação do genoma foi feita com os programas Prokka (45) e barnap (<https://github.com/tseemann/barnap>).

7.4 QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME POR VIOLETA DE GENCIANA

A partir do estoque a -80°C, foi inoculado 10 µL em 5 mL de meio LB, o qual foi incubado em temperatura ambiente a 180 RPM em agitador (NT-150, Kline). Um inóculo de *Escherichia coli* J96 também foi feito em 5 mL de LB e esse foi incubado a 37°C e 180 RPM em shaker (6430B, Thoth equipamentos). Ambas as culturas foram incubadas overnight. Em seguida, 1 mL das culturas foi coletado e sua absorbância foi medida em 600 nm em espectrofotômetro (Spectramax V5, Molecular devices) e volumes de cada cultura foram inoculadas em placas de 96 poços de poliestireno (Cellstar, Grenier bio-one) contendo meio LB e em triplicata, de forma que o volume final foi de 250 µL e a quantidade de bactérias fosse aproximadamente igual, de acordo com a seguinte fórmula:

$$V_{\min} (20\mu\text{L}) = (V_{\max} \cdot OD_{\min}) OD_{\max}^{-1}$$

Onde V_{\min} corresponde ao volume de inóculo da cultura com menor densidade ótica (20 µL);

V_{\max} corresponde ao volume de inóculo da cultura com maior densidade ótica;

OD_{min} é a menor densidade ótica dentre as duas culturas;

OD_{máx} é a maior densidade ótica dentre as duas culturas.

Poços contendo apenas LB em triplicata foram feitos como controle negativo. Após inóculo, a placa ficou por 24 h a 25°C. Após isso, o sobrenadante dos poços foi retirado, e lavado três vezes com 250 µL de PBS. Em seguida, foram adicionados 250 µL de metanol e os poços foram incubados por 15 minutos, em capela de exaustão. Depois, o volume residual de metanol foi removido e foram adicionados 250 µL de violeta de genciana (Renylab). Em seguida, o excesso de corante foi removido com água corrente e a placa foi incubada a temperatura ambiente até secar. Em seguida, foi adicionado 250 µL de solução de Ácido acético 33% (v/v) para a ressuspensão das células aderidas. Por fim, A absorvância dos poços foi medida em espectrofotômetro (Spectramax V5, Molecular devices) em 570nm.

7.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A partir de pré-inóculo do isolado em LB, 10 µL foram inoculados em placas de 12 poços de poliestireno (Cellstar, Grenier bio-one), cujos poços continham 1 mL de LB. Essas foram incubadas por 24 h a 25°C na presença de lamínulas estéreis para microscopia. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e cobertas em solução fixadora PBS-PFA (Paraformaldeído 4% (v/v), 137,0 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂PO₄, 1,5mM K₂HPO₄) e incubadas a 4°C overnight. Em seguida, a solução foi retirada e as amostras foram pós-fixadas ao adicionar uma gota de pipeta Pasteur de solução de tetróxido de ósmio (1% (v/v) OsO₄) e ao incubá-las por 30 minutos em ambiente ausente de luz. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada três vezes e então desidratadas ao serem cobertas e incubadas serialmente por soluções de acetona (50%, 70%, 90%, 100% (v/v) C₃H₆O) por cinco minutos cada, sendo que a incubação com solução 100% acetona ocorreu duas vezes seguidas. A secagem das amostras se deu em lavagem de solução de CO₂ a ponto crítico (Balzers CPD 030, Balzers Union AG) e a metalização ocorreu em seguida em metalizador com vapor de ouro (Balzers SCD 050, Balzers Union AG). Por fim, as amostras foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM -70001F, JEOL Ltd.).

7.6 ENRIQUECIMENTO DE PIGMENTO MARROM E ANÁLISE DE SOLUBILIDADE

O enriquecimento do pigmento marrom foi feito ao assumir que se tratava de uma melanina e seguiu de forma modificada do trabalho de Amin e colegas (39). Após 72 horas de cultivo do isolado bacteriano em meio M9 com $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de paracetamol, a cultura foi coletada em tubos cônicos de 50 mL (Falcon) e esses foram fervidos por uma hora, para evitar a formação de complexos melanina-proteína. Em seguida, os tubos foram centrifugados a $1000 \times g$ por 2 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento foi lavado três vezes com 50 mL de solução 0,1 M de ácido clorídrico a $1000 \times g$ por 2 minutos. A lavagem foi feita uma última vez com 10 mL de etanol absoluto a $1000 \times g$ por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi deixado para secar ao longo da noite.

O ensaio de solubilidade em diferentes solventes também foi feito de forma modificada à relatada em Amin e colegas (39). Um miligrama da substância marrom foi adicionada a 1 mL de cada solvente e vortexada por 1 minuto. Os solventes testados foram água deionizada, solução 0,1 M de ácido clorídrico em água, solução 0,4% de hidróxido de sódio em meio aquoso, metanol absoluto, etanol absoluto, isopropanol absoluto, 2-butanol absoluto, Hexano absoluto, clorofórmio absoluto e Dimetil sulfóxido (DMSO) absoluto. Caso fosse possível a visualização da substância em agregados, a solução era caracterizada como incapaz de solubilizá-la.

7.7 ESPECTROSCOPIA EM ESPECTRO DE LUZ ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

Foi dissolvido 1 mg da substância marrom em 1 mL de DMSO e a solução resultante foi introduzida em cubeta de quartzo (Perkin Elmer). A partir desse material, foi feita leitura em modo de espectro no espectrofotômetro Spectramax V5, nos comprimentos de onda de 200 nm a 700 nm, com intervalo de medida a cada 10 nm. A mesma leitura foi feita para cubeta contendo apenas 1 mL de DMSO, a título de comparação.

7.8 ESPECTROSCOPIA EM INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A amostra marrom foi triturada com gral e pistilo em presença de pó de brometo de potássio grau FTIR (KBr, Sigma Aldrich) na proporção 1:100 mg. O material resultante foi prensado em formato de pastilha por prensa hidráulica manual. A pastilha então teve seu espectro de absorbância em infravermelho lido pelo espectrômetro de infravermelho (Varian 640) na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} e em atmosfera de ar.

7.9 ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA

A análise de termogravimetria foi feita em aparelho DTG 60H (Shimadzu). As condições do experimento foram de atmosfera inerte de N_2 , fluxo de gás de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, rampa de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, varredura da temperatura ambiente a 1000°C e com 12,89 mg da substância marrom em cadinho de platina.

7.10 CURVA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO KP3

Foram coletados 200 μL de uma cultura overnight em meio de lisogenia LB (10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ triptona, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ extrato de levedura, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) e a esses foram adicionados 800 μL de meio LB e teve sua densidade óptica aferida em 600 nm em espectrofotômetro (Spectramax V5, Molecular devices), a qual resultou em valor de 0,324, de forma que a OD da cultura sem diluição foi de 1,620. Em seguida, 1 mL da cultura foi centrifugado a 10.000xg por 10 minutos em centrífuga (8R Megafuge, ThermoFisher Scientific), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em solução de sais M9. Em seguida, essa suspensão foi novamente centrifugada, o sedimento descartado e o corpo de fundo suspenso em solução de sais M9. A partir dessa suspensão, 10 μL foram coletados e inoculados em 100 mL de meio de sais M9 suplementado com 3,3 mM de Paracetamol e outros 10 μL foram

inoculados em 100 mL de meio de sais M9 suplementado com 2,6 mM ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) de Cafeína. Essas culturas foram incubadas por 72 h a 25°C e 180 RPM em shaker (6430B, Thoth equipamentos). Durante os tempos de 0 h, 24 h, 48 h e 72 h de incubação, foram coletadas amostras para diluição em série de 10^0 a 10^{-5} e plaqueamento de 50 μL destas diluições em meio LB sólido em triplicata. As placas de LB inoculadas com diluições foram incubadas a 25°C por 24 h e então foram contadas as colônias. As culturas selecionadas para contagem foram aquelas as quais obtiveram entre 30 e 300 colônias.

7.11 ANÁLISE DOS GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA DEGRADAÇÃO DE PARACETAMOL

A designação de ortologias KEGG foi feita por meio dos programas KofamScan (https://github.com/takaram/kofam_scan) e KEGGDecoder (<https://github.com/bjtully/BioData/tree/master/KEGGDecoder>). A comparação do gene codificador da enzima ácido 4-hidroxifenilacético 3-hidroxilase de *E.coli* (código de acesso em banco *Protein DataBank* PDB6EB0) com o gene de KpV3 foi feita ao alinhar essas sequências com o programa tBLASTn, em parâmetros padrão.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA A DEGRADAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

Uma amostra de cerca de 50 mL de água foi coletada a partir do lago Paranoá. O local de coleta está descrito conforme a figura 10. O local de coleta foi escolhido pois, ao receber efluente tratado da estação de tratamento de esgoto, é um local com uma concentração de xenobióticos potencialmente maior que em demais pontos do lago. Esse local de coleta também pode ter propiciado a descoberta de bactérias com resistência a antimicrobianos, como discutido no capítulo 2.

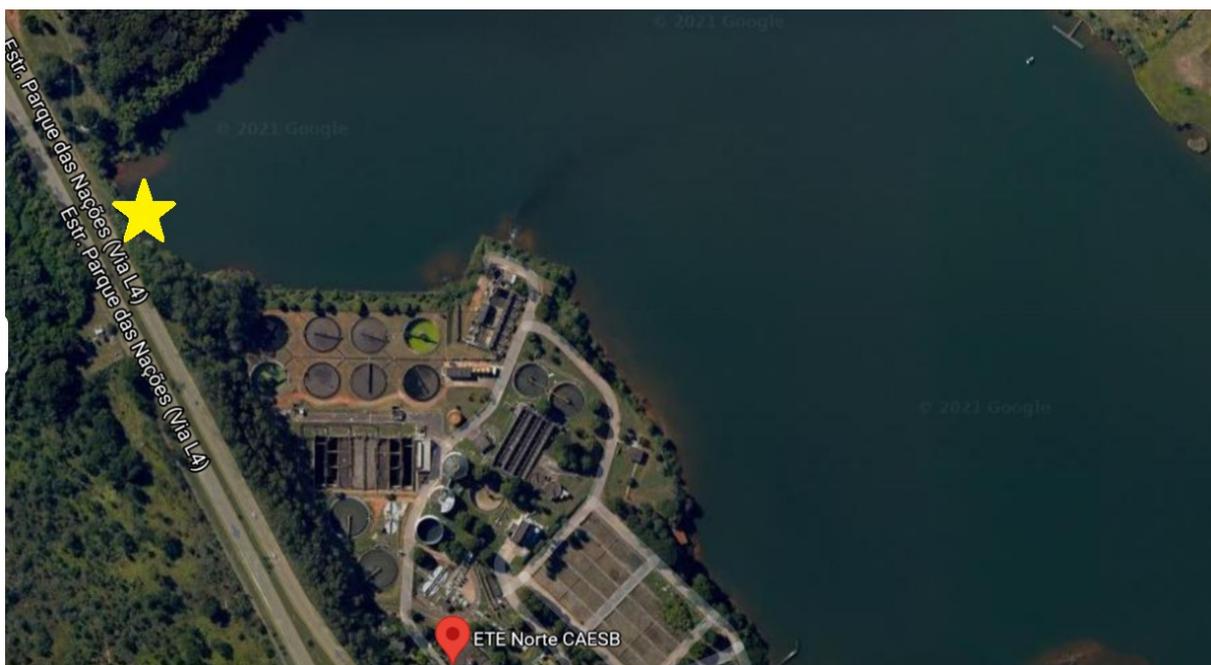


Figura 10. Imagem de satélite da estação de tratamento de esgoto norte da CAESB. A estrela amarela indica o ponto de coleta de amostra, nas coordenadas geográficas 15,740962S e 47,881235O. O ponto vermelho denota a estação de tratamento de esgoto da Asa norte, cujo efluente tratado é liberado no lago. Fonte: Google maps.

Embora não estejam disponíveis na literatura científica dados acerca de concentrações de paracetamol no lago Paranoá, da Costa *et al* (2016) (46) quantificaram as concentrações de outros xenobióticos presentes no lago: nonilfenol, bisfenol A, Ftalato de dietila, bezafibrato e

caféina. Os autores encontraram dentre suas amostras a variação, das concentrações de caféina observadas entre 67,9 ng.L⁻¹ a 211,9 ng.L⁻¹. As concentrações desse fármaco dentro das unidades de tratamento Sul e Norte da CAESB foram de 1056,7 ng.L⁻¹ e 3190,9 ng.L⁻¹ respectivamente. A caféina foi o xenobiótico com maior concentração observada dentre os poluentes analisados. De acordo com os autores, esses dados indicam que o processo de tratamento de esgoto das unidades é capaz de reduzir significativamente as concentrações de caféina do esgoto, porém as concentrações deste fármaco encontradas no lago provavelmente se devem a pontos difusos de poluição doméstica. Além dos dados de concentração de caféina do estudo, as propriedades dos fármacos de interesse justificam o local de coleta, arredores da estação de esgoto, e a coleta de amostras da coluna d'água. Essas propriedades são a hidrofiliabilidade razoável das moléculas, bem como sua baixa recalcitrância, dependendo, portanto, de fontes primárias de poluição para manter concentrações maiores na água. Dessa forma, nesse ambiente de coleta é onde se espera, teoricamente, que exista maior pressão seletiva em microrganismos capazes de degradar tais moléculas.

A partir dos inóculos da água do lago coletada, foram obtidas culturas em placas de meio M9 suplementadas com 500 mg.L⁻¹ de paracetamol, ao serem inoculadas por superfície e profundidade. Após 24 h de incubação a 25°C, foram observadas colônias transparentes nas placas (figura 11 A e B), enquanto que após 48 h de crescimento, manchas marrons foram observadas ao redor de algumas colônias (figura 11 C e D). A estratégia de prospecção se dá pelo isolamento de colônias de microrganismos capazes de usar paracetamol como fonte única de carbono.

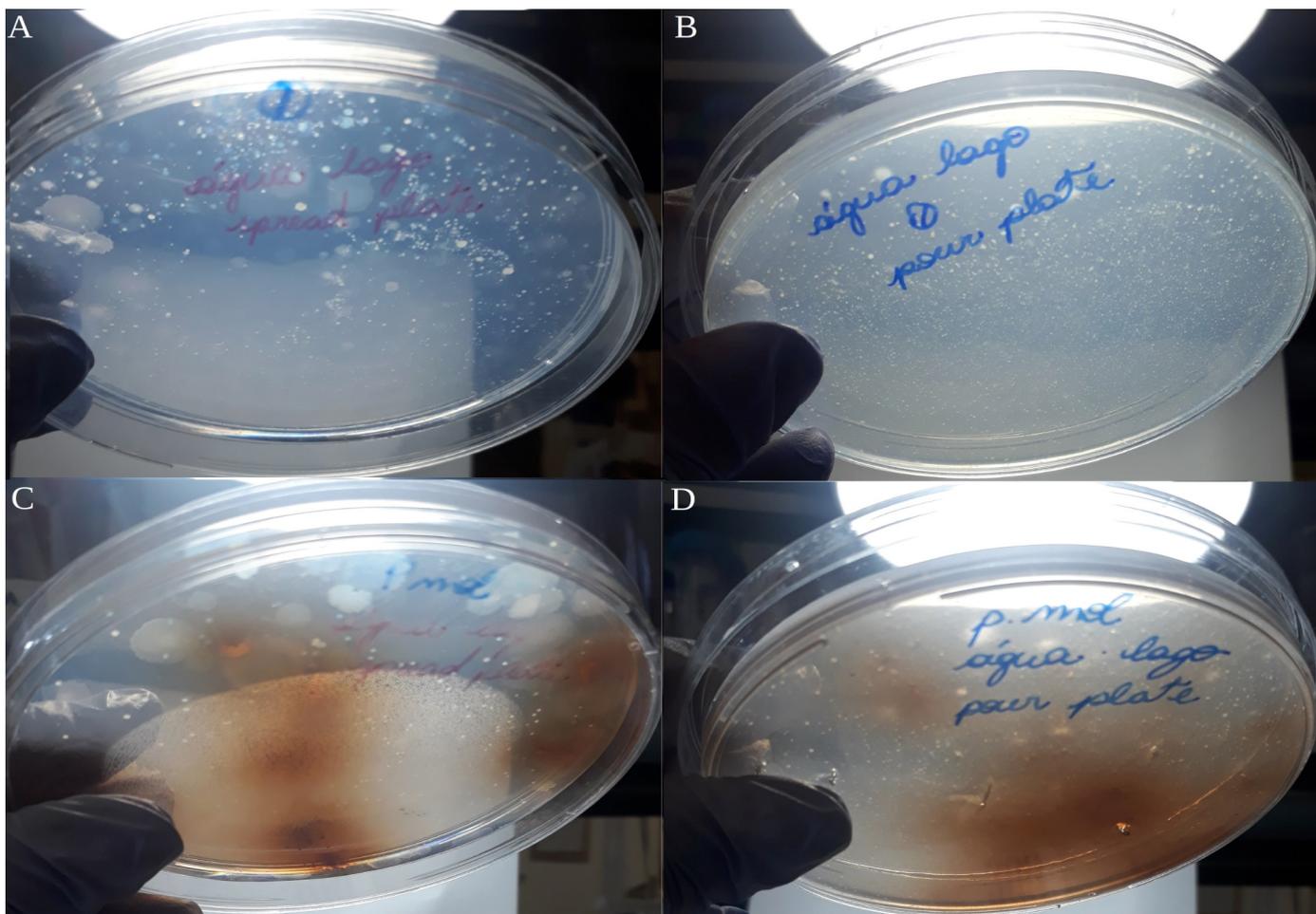


Figura 11. Placas de meio M9 suplementados com de paracetamol. As placas foram incubadas após 24 h (A e B) e 48 h com inóculo de água do lago Paranoá (C e D).

No entanto, nessa primeira cultura, as colônias observadas podem ter crescido no meio ao utilizar nutrientes vindos com o inóculo do lago Paranoá. Dessa forma, seis colônias da placa inoculada em superfície e da placa inoculada em profundidade foram inoculadas em meio M9 líquido suplementadas com 500 mg.L^{-1} de paracetamol e essas culturas foram incubadas a 25°C por 72 h. Após esse período, dois tubos apresentaram crescimento e precipitado marrom. A partir das culturas líquidas, foram feitos inóculos, por estria em esgotamento, em placa de meios sólidos M9 suplementado com paracetamol, as quais foram incubadas a 25°C por 24 h (figura 20) e uma dessas colônias, referida daqui em diante como isolado KpV3, foi selecionada para o prosseguimento do trabalho. Tal isolado encontra-se cadastrado na plataforma Sisgen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) conforme anexo A. Outros meios estão descritos para permitir também o cultivo de microrganismos fastidiosos a partir de rios e lagos, como o Reasoner's 2A (47), o que seria mais adequado para a caracterização de comunidades

microbianas do lago capazes de degradar os fármacos. Porém, o presente estudo visa a caracterização de microrganismos utilizáveis em aplicações tecnológicas para a remoção dos fármacos em sistemas de tratamento de esgoto ou de efluentes industriais, de forma que o isolamento de microrganismos capazes de crescer em meio nutricionalmente simples, como o M9, é de maior interesse, por selecionar microrganismos com necessidades nutricionais menores e, assim serem de maior adaptabilidade em ambientes diversos para biorremediação. Esse tipo de prospecção não é adequado ainda para se caracterizar a comunidade de microrganismos capazes de consumir xenobióticos devido à baixa capacidade de cultivo de microrganismos potencialmente relevantes e pelo viés de seleção de microrganismos de crescimento rápido (11). Por fim, a prospecção de microrganismos autóctones do lago Paranoá permite a eles uma adaptação mais eficiente às condições abióticas desse e à competição com outros microrganismos do lago.

8.2 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO ISOLADO

Para começar as análises, foi feita a extração de DNA genômico da bactéria, seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação de fragmento do gene 16S da bactéria e sequenciamento desse. Em um ensaio piloto, ampliações inespecíficas foram observadas em reações cuja temperatura de anelamento de 50°C. Assim, diferentes temperaturas de anelamento, entre 50°C e 65°C foram testadas para a reação, conforme figura 12.

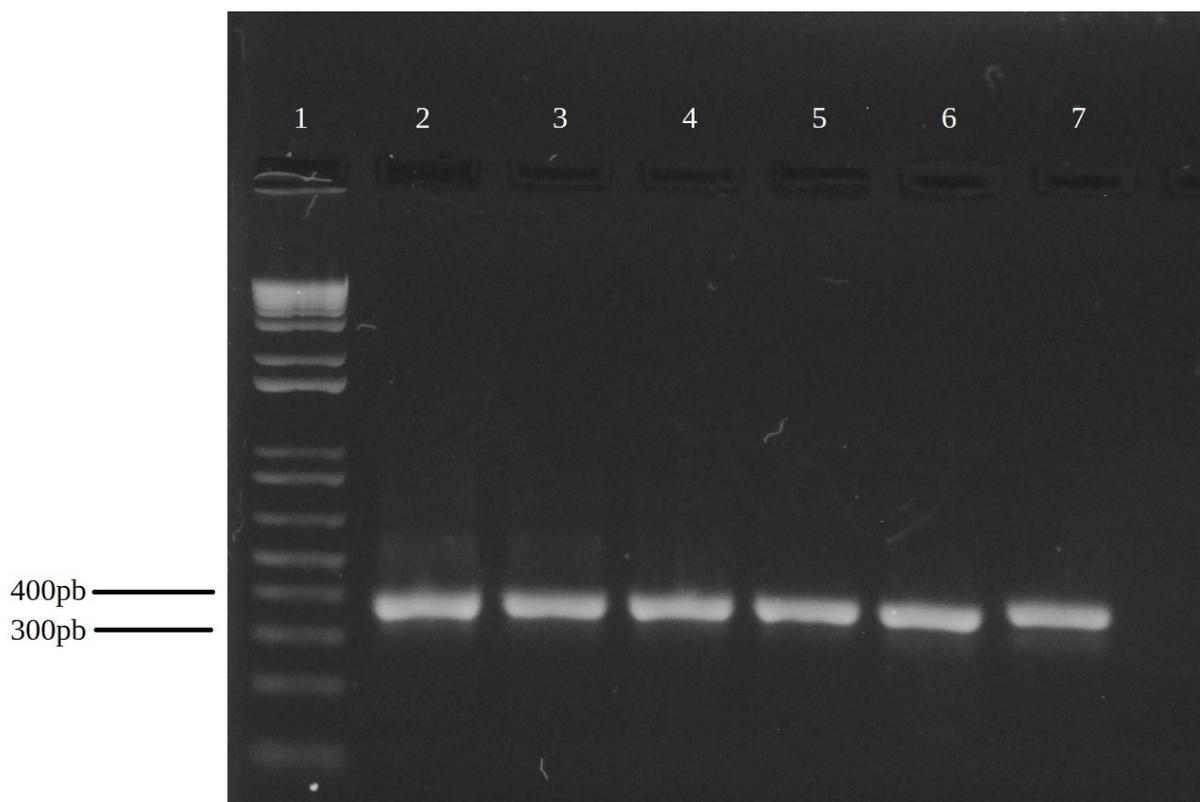


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos *amplicons* obtidos a partir de PCR em gradiente feito a partir do DNA genômico extraído da cepa KpV3. 1- Ladder 1Kb Plus (Invitrogen), 2- PCR com temperatura de anelamento de 50,0°C, 3- PCR com temperatura de anelamento de 53,9°C, 4-PCR com temperatura de anelamento de 56,0°C, 5-PCR com temperatura de anelamento de 58,5°C, 6- PCR com temperatura de anelamento de 62,4°C, 7- PCR com temperatura de anelamento de 65,0°C, 8- Controle negativo.

Reações feitas com temperaturas de anelamento entre 50°C e 56°C apresentaram ampliações inespecíficas acima do tamanho esperado de 319 pb. Já aquelas feitas com temperaturas acima destas não aparentaram ter estas ampliações. Dessa forma, os *amplicons* correspondentes à reação cuja temperatura de anelamento foi de 65°C foram enviados para sequenciamento. O resultado do sequenciamento, tanto para o *iniciador* RW01F (*forward*) quanto para o iniciador RW01R (*reverse*), após busca no banco *Nucleotide* (NCBI) por meio de BLASTn indica que o isolado V3 pertence ao gênero *Klebsiella* (figuras 13 e 14). A busca em BLASTn gerou resultados de mesma qualidade (identidade de 99% e cobertura de 100%) para diferentes espécies, como *K. pneumoniae*, *K. varicola*, *K. quasipneumoniae* e *K. aerogenes*, não sendo possível assim a identificação em nível de espécie. A taxonomia deste gênero vem mudando nos últimos 15 anos, com a descrição de novas espécies como *K. varicola* (64) e *K. africana* (65). Desse modo, alguns autores (66) consideram análises como fingerprint proteômico por MALDI-TOF/MS, PCR multiplex e identidade média de

nucleotídeos entre genomas (do inglês, *average nucleotide identity*) são as melhores formas para a identificação de espécies do gênero (figura 15). Uma discussão mais aprofundada acerca da identificação de espécies no gênero *Klebsiella* se dá na introdução do capítulo 2.

Klebsiella pneumoniae isolate KSH203 chromosome, complete genome

Sequence ID: [CP034327.1](#) Length: 5464059 Number of Matches: 14

Range 1: 1033970 to 1034288 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
582 bits(315)	1e-162	318/319(99%)	1/319(0%)	Plus/Minus

Features: [rRNA-16S ribosomal RNA](#)

Query	1	CTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACC	60
Sbjct	1034288	CTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACC	1034229
Query	61	TCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATC	120
Sbjct	1034228	TCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATC	1034169
Query	121	GCTAGTAATCGTAGATCAGAAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC	180
Sbjct	1034168	GCTAGTAATCGTAGATCAGAAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC	1034109
Query	181	CCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGC	240
Sbjct	1034108	CCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGC	1034049
Query	241	TTACCACITTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCT	300
Sbjct	1034048	TTACCACITTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCT	1033989
Query	301	GCGGTTG-ATCACCTCCTT	318
Sbjct	1033988	GCGGTTGGATCACCTCCTT	1033970

Figura 13. Alinhamento entre a sequência obtida a partir do sequenciamento do iniciador senso do *amplicon* da PCR contra fragmento do gene codificador para rRNA 16S (*Query*) e o melhor *hit* encontrado no banco *Nucleotide* para essa sequência (*Sbjct*). A identidade entre as sequências é de 99%, com uma deleção ocorrendo na sequência *Query*.

Klebsiella pneumoniae strain NCTC13635 genome assembly, chromosome: 1

Sequence ID: [LR134162.1](#) Length: 5252633 Number of Matches: 8

Range 1: 3650729 to 3651044 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
579 bits(313)	9e-162	315/316(99%)	0/316(0%)	Plus/Minus

Features: [rRNA-16S ribosomal RNA](#)

Query	1	AGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGC	60
Sbjct	3651044	AGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGC	3650985
Query	61	AACCCACTCCCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGTAG	120
Sbjct	3650984	AACCCACTCCCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGTAG	3650925
Query	121	CATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAAT	180
Sbjct	3650924	CATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAAT	3650865
Query	181	CCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCGGCTTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTAT	240
Sbjct	3650864	CCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCGGCTTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTAT	3650805
Query	241	ATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCC	300
Sbjct	3650804	ATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCC	3650745
Query	301	CCACCTTCCCTCCAGT	316
Sbjct	3650744	CCACCTTCCCTCCAGT	3650729

Figura 14. Alinhamento entre a sequência obtida a partir do sequenciamento do iniciador antisense do amplicon da PCR contra fragmento do gene codificador para rRNA 16S (*Query*) e o melhor *hit* encontrado no banco *Nucleotide* para essa sequência (*Sbjct*). A identidade entre as sequências é de 99%, com uma mutação *mismatch* ocorrendo entre as sequências.

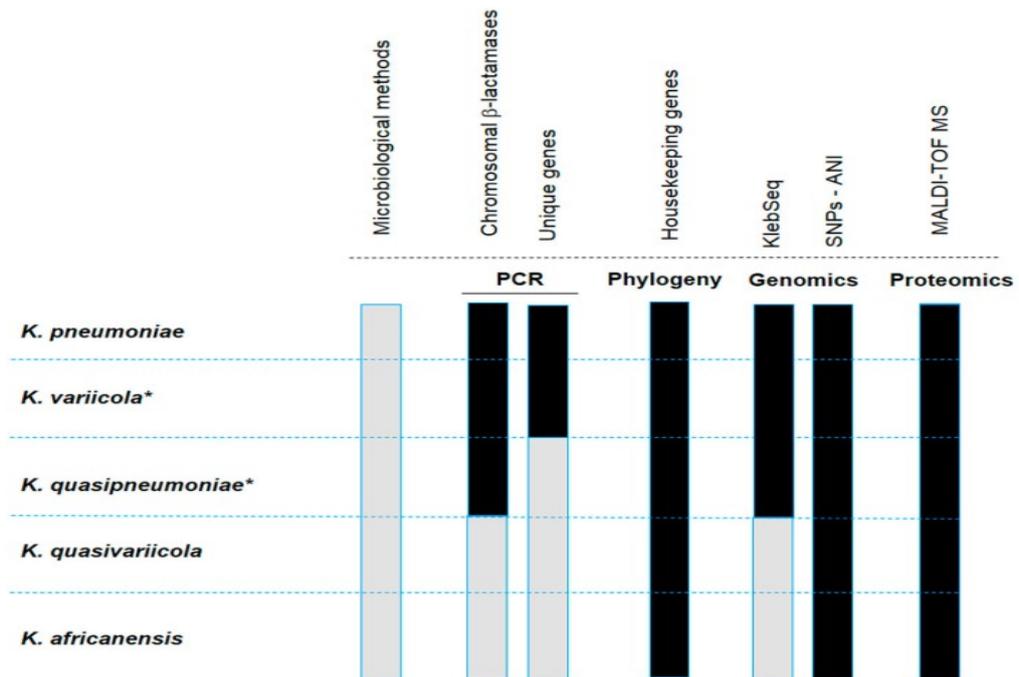


Figura 15. Capacidade de diferenciação de *K. pneumoniae* e espécies recentemente descritas para o gênero *Klebsiella* em diferentes métodos. Aqueles descritos em barras negras conseguem discernir entre as espécies indicadas, enquanto os representados por barras cinzas não. Dentre os métodos de identificação estão métodos microbiológicos (ex: série bioquímica), PCR de genes únicos ou de resistência a lactamases, filogenia por genes de manutenção, análises genômicas como sequenciamento de genes característicos (Klebseq) e análises de identidade e polimorfismos de base única e análises de fingerprint proteômico (MALDI-TOF/MS). Os asteriscos denotam inclusão de sub-espécies na diferenciação. Retirado de Rodríguez-Medina *et al*, 2019.

A identificação do isolado como *Klebsiella* sp. leva a algumas considerações. Trata-se de um gênero com exemplares encontrados em solo, água doce e em associação com plantas e animais invertebrados e vertebrados (67) e até mesmo na estação espacial internacional (68). Higgins e Hohn (69) testaram a influência de poluentes comuns de sistemas aquáticos em concentrações de parte por milhão e parte por bilhão em uma linhagem de *K. pneumoniae*. Eles observaram que análogos de hormônios como estrona e estradiol, herbicidas como atrazina e simazina, o inseticida diazinon e cafeína não afetaram o crescimento da linhagem. Já Blin e colaboradores (70) caracterizaram a diversidade de compostos que três espécies de *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. variicola* e *K. quasipneumoniae*), distribuídas em 36 linhagens, podem usar como fontes de carbono e energia. Em média, cada linhagem foi capaz de utilizar 110 compostos como fontes únicas de carbono e 72 como fontes únicas de nitrogênio em meios de cultura. A linhagem capaz de usar a menor quantidade de compostos, denominada CIP 52.145, foi isolada em 1935 e vem sendo usada desde então em estudos laboratoriais. Os

autores sugerem que após décadas de cultivos em laboratório, essa linhagem acumulou mutações em genes importantes para o consumo de determinados compostos. Ainda assim, eles sugerem que a capacidade de degradar diferentes compostos para servirem como fontes de nutrientes e energia é alta. Existem ainda descrições de bactérias desse gênero participando na degradação de xenobióticos orgânicos, como nitroglicerina (71) e dodecil sulfato de sódio (72). Além disso, um estudo descreve a degradação de pigmentos industriais e a produção de gás hidrogênio simultaneamente por *K. oxytoca* (73). Dada e colaboradores (74) compararam por metagenômica a composição da microbiota bacteriana de mosquitos *Anopheles albimanus*, principais vetores costais da malária na América Latina, suscetíveis e resistentes a inseticidas organofosfatados. A espécie que apresentou maior diferença em predominância de *reads* de sequenciamento entre esses grupos de mosquitos foi *K. pneumoniae* (49% dos *reads* do metagenoma em mosquitos suscetíveis e 74% dos *reads* do metagenoma em mosquitos resistentes), além de ser a espécie mais prevalente em ambas as condições. Embora essa seja uma correlação e possam existir vieses quanto à coleta de DNA da microbiota, os autores ainda destacam que isolados de *K. pneumoniae* já foram descritos na degradação de pesticidas organofosfatados, DDTs, triazinas, endossulfano, dentre outros. Considerando a distribuição ambiental abrangente desse gênero no ambiente e sua capacidade de degradar diversos compostos orgânicos, esse se torna atrativo para estudos de degradação de xenobióticos. Finalmente, é importante destacar que uma linhagem de *Klebsiella* sp. já foi descrita em associação com partículas de carvão para a biorremediação de acrilamida em solos (75), assim se demonstra a possibilidade de se usar uma linhagem ou isolado desse gênero em sistemas de carreamento por carvão.

Em relação às moléculas poluentes do presente trabalho, existe uma descrição de um consórcio de *Klebsiella* sp e *Rhodococcus* sp. capaz de degradar cafeína. A partir desse consórcio, os autores conseguiram isolar uma cafeína oxidase, o que seria indicativo de que a molécula foi degradada por meio de oxidação C8 (76). Summers *et al* (2015) (22) encontraram genes relacionados a ambas as vias metabólicas de degradação de cafeína (via de demetilação e via de oxidação C8) em genomas de *Klebsiella*, por meio de nBLAST destes contra o banco nucleotídeo. No entanto, não encontramos trabalhos na literatura científica relacionando a biodegradação de cafeína e potenciais genes envolvidos em uma mesma linhagem de *Klebsiella*. Já para o paracetamol, não pudemos encontrar registros prévios de degradação desse fármaco por *Klebsiella* na literatura científica, o que indica que o presente trabalho pode representar um registro inédito também nesse aspecto.

Como citado anteriormente, *Klebsiella* spp. são capazes de ocorrer em diversos ambientes e de catabolizar vários compostos orgânicos distintos. Assim, é razoável se supor que esse gênero de bactérias corresponde a organismos generalistas para ocupação de nichos e que, ao ocupar tais nichos, sejam possíveis várias interações diferentes nas comunidades microbianas presentes. Essas duas características promovem a geração de genomas acessórios grandes, por mecanismos de transmissão horizontal de genes (77). Dados genômicos coletados para o gênero apoiam essas suposições. Holt e colaboradores (2015) (78) analisaram 328 genomas de três espécies filogeneticamente próximas de *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* e *K. varicola*), os quais foram obtidos a partir de cepas de diferentes continentes e nichos ambientais (infecções em humanos adquiridas em hospitais ou em comunidade, infecções em demais mamíferos ou isolados a partir de carcaças). Nesse trabalho, os autores observaram o compartilhamento de 1888 genes em comum aos genomas. A mediana de genes em cada genoma foi de 5705 genes e a mediana de genes “acessórios” por genoma, isso é, genes que não foram encontrados em todos os genomas, foi de 3817. Sessenta e seis por cento dos genes acessórios foram encontrados em <5%, sendo um terço dos genes acessórios encontrados em apenas um genoma. Os genomas analisados e a análise do conteúdo G+C indica que os genes acessórios podem ter origens filogenéticas diversas, como a partir de enterobacteriales, *Vibrio* e *Acinetobacter*. Assim, os autores argumentam que a plasticidade genômica do gênero *Klebsiella* é alta.

Em relação ao genoma do isolado KpV3, a análise de ortólogos simples por BUSCO demonstra que a estratégia de se montar e polir o genoma com os programas Flye, Medaka e Homopolish resultou em uma completude de genoma de aproximadamente 97,9% para esse grupo de genes. Outras estratégias utilizando o programa montador Canu ou menos passos de polimento renderam resultados piores de completude, com frações maiores desses genes não sendo encontrados ou encontrados de forma fragmentada (Figura 16). Dessa forma, a versão do genoma obtida a partir destes três programas foi utilizada para as demais análises.

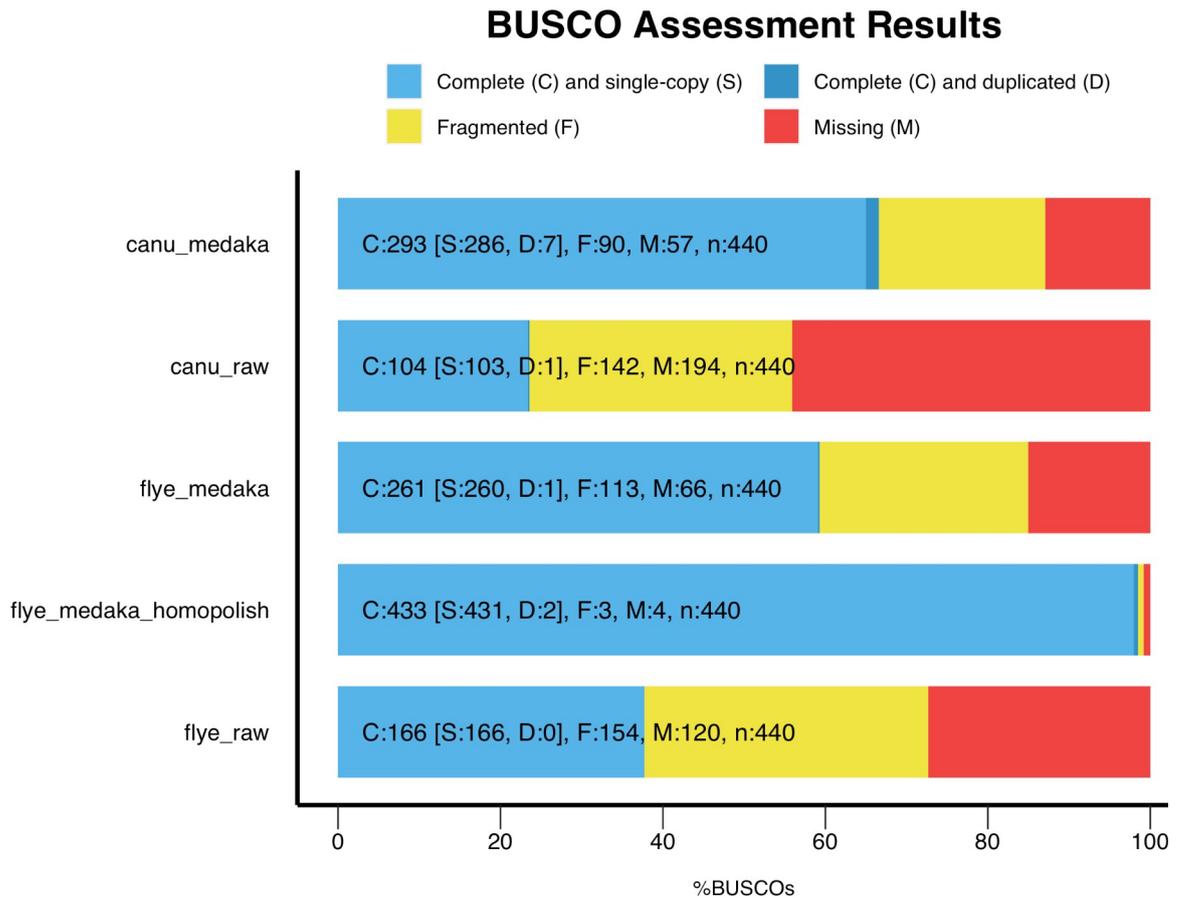


Figura 16. Análise de completude do genoma do isolado KpV3. Foram utilizadas diferentes estratégias de montagem e polimento e a avaliação de completude se deu por meio da busca de ortólogos únicos em Enterobacteriales no programa BUSCO.

Após os passos de montagem e anotação do genoma, esse se encontra com sete sequências contíguas (*contigs*), tamanho de aproximadamente 5.4 Mb, cerca de 5000 genes, 25 sequências relacionadas a rRNA e 86 sequências relacionadas a tRNA (Tabela 2)

Tabela 2. Sumário das características do genoma de KpV3 após montagem e anotação.

Estatísticas genéricas do genoma polido da KpV3								
Programa	Contigs	Tamanho			N. genes			
		Total	N50	GC %	N. genes (>300bp)	rRNA	tRNA	
Flye	7	5.445.572	5.363.194	57,36	5132	4656	25	86

Já a análise de *Average Nucleotide Identity* (do inglês, Identidade Média de Nucleotídeos) contra os genomas de *Klebsiella* disponíveis no Genbank mostra que há genomas com índice >99,5% da espécie *K. pneumoniae*, sendo, portanto, o isolado V3 pertencente a essa espécie (Tabela 3)

Tabela 3. Valores de ANI referentes aos quatro genomas depositados em Genbank com maior similaridade em relação ao genoma de KpV3.

Valores ANI (Average Nucleotide Identity) entre o genoma deste estudo e os depositados no NCBI.	
Genoma	ANI
Klebsiella/pneumoniae/2504/ GCF_011044895.1_ASM1104489v1_genomic.fna.gz	99,7129
Klebsiella/pneumoniae/VRES1229/ GCF_900172825.1_20794_7_119_genomic.fna.gz	99,7004
Klebsiella/pneumoniae/k1766/ GCF_900084565.1_11983_8_78_genomic.fna.gz	99,6998
Klebsiella/pneumoniae/2471/ GCF_011044835.1_ASM1104483v1_genomic.fna.gz	99,6986

8.3 COLONIZAÇÃO SOBRE PARTÍCULAS DE CARVÃO PELO ISOLADO KPV3

Um dos interesses do trabalho era se obter bactérias capazes de colonizar as partículas de carvão geradas no instituto de química. Para tal, foram feitos ensaio de biofilme, como uma aproximação da capacidade de colonização da bactéria em superfícies sólidas e micrografias de microscopia eletrônica, para se observar a associação das bactérias com as partículas de carvão. O ensaio de biofilme com violeta de genciana mostra que a bactéria é capaz de produzir biofilme em temperatura ambiente, o que é desejável uma vez que a aplicação dos carvões também se daria nessa temperatura (figura 17).

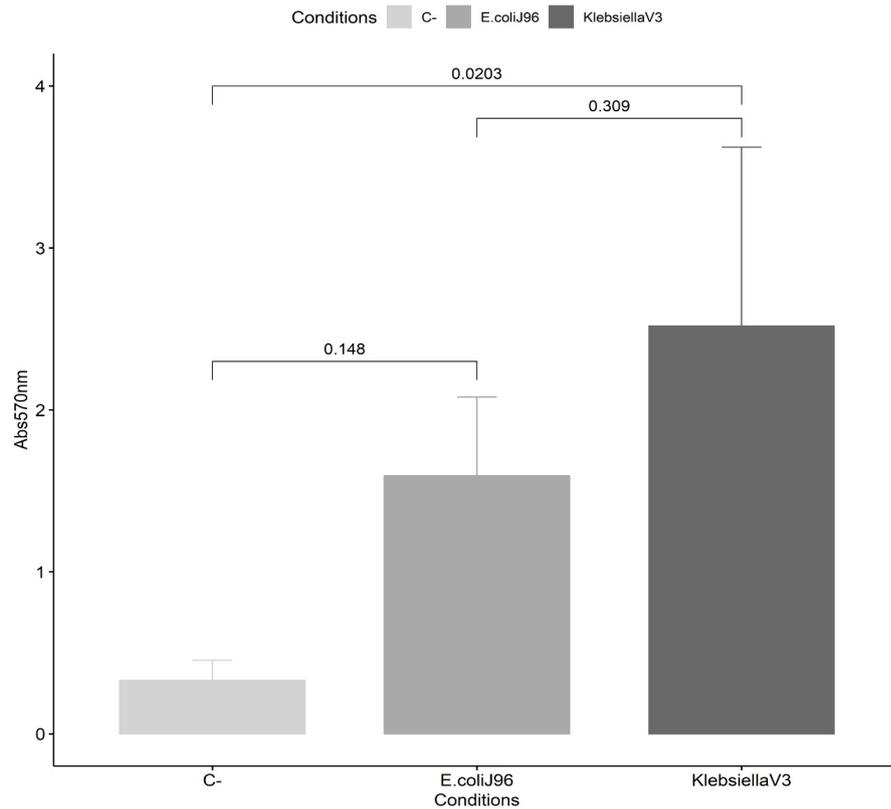


Figura 17. Produção de biofilme pelo Isolado KpV3 em quantificação de biofilme por cristal violeta. Os controles foram linhagem de *E. coli* J96 como controle positivo e apenas meio como controle negativo. A análise estatística se deu com teste-T seguido de pós-teste de Tukey.

Micrografias obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de lamínulas colonizadas pela bactéria (figura 18) confirmam que essa possui morfologia de cocobacilo, de aproximadamente 1 μm a 2 μm de comprimento.

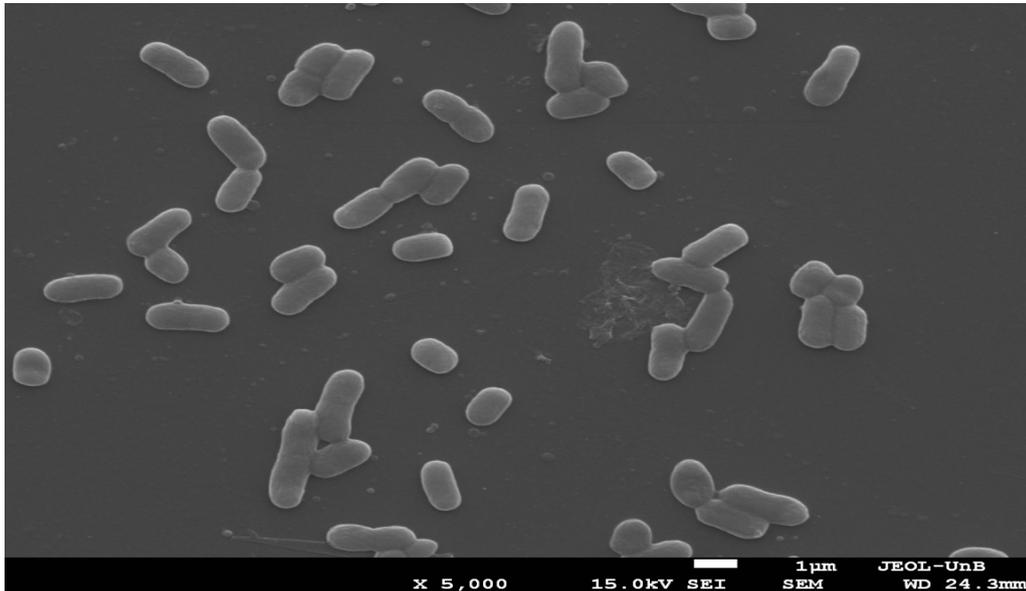


Figura 18. Microscopia Eletrônica de Varredura do isolado KpV3 sobre lamínula de vidro em aumento de 5000x.

Após 24 horas de associação das bactérias com as partículas de carvão em meio LB, observa-se que essas foram capazes de se espalhar pela superfície do material, o que sugere seu potencial como colonizadores desse. (figura 19). Porém, algo que nos chamou a atenção e foi inesperado foi a produção de precipitado marrom a partir das culturas do isolado na presença de paracetamol.

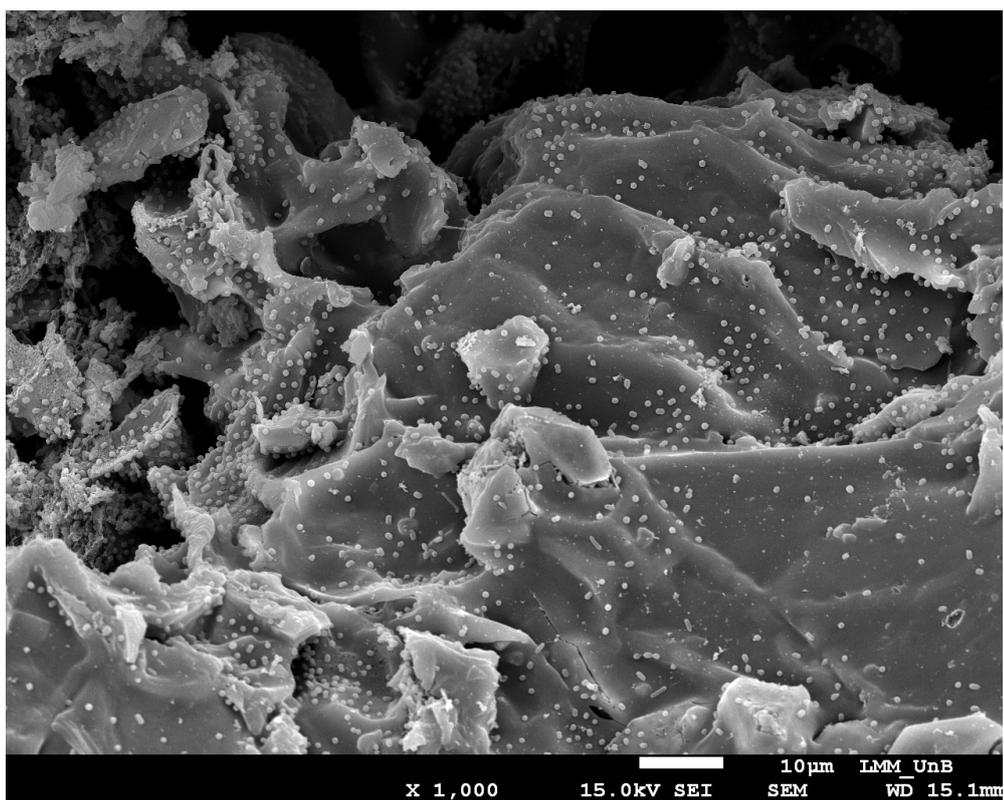


Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura do isolado V3 sobre partículas de carvão. Observação após 24 h de cultivo em meio LB.

8.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO PIGMENTO MARROM OBTIDO A PARTIR DE CULTURAS MICROBIANAS COM PARACETAMOL.

O isolado KpV3 apresentou a produção de pigmento marrom quando em cultura com paracetamol. De Gusseme *et al* (2011) (48) observaram a formação de pigmento marrom em seu sistema de degradação de paracetamol com as bactérias *Delftia tsuruhatensis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Embora os autores não tenham caracterizado a estrutura molecular desse precipitado, eles apenas o observaram quando paracetamol era incluído nas culturas e eles especulam que o precipitado seja um polímero de catecol feito a partir da degradação do fármaco.

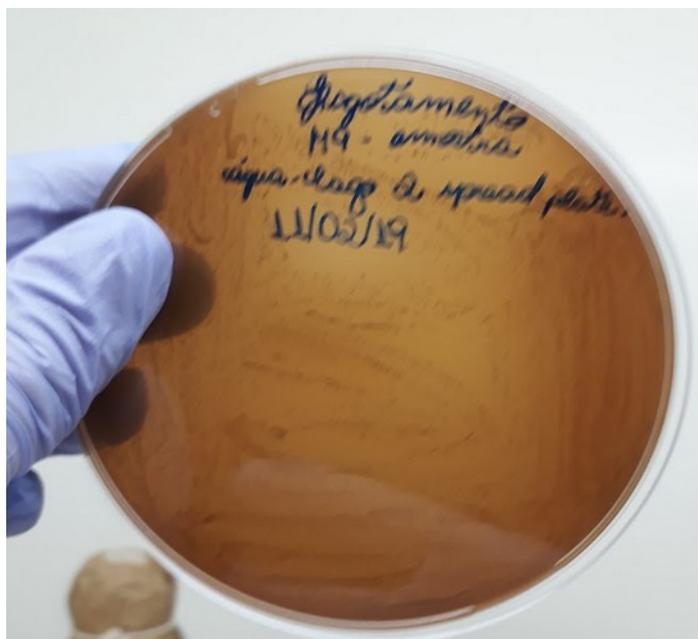


Figura 20. Isolado kpV3 crescido em meio M9 suplementado com 500 mg.L^{-1} de paracetamol

Considerando a hipótese de de Gusseme *et al* (2011) (48) para a natureza do composto marrom, bem como outras evidências, nós hipotetizamos que tal composto seria uma

melanina. Segundo Solano (2014) (49), a palavra melanina vem do grego antigo, *melanos*, que significa “escuro” e esta classe de moléculas pode ser definida como “polímeros heterogêneos derivados da oxidação de fenóis e subsequente polimerização de intermediários fenólicos e quinonas”. Já quinonas são atualmente definidas pela União Internacional de Química Pura e aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) como “compostos contendo uma estrutura diona completamente conjugada, como, por exemplo, benzoquinonas, derivados de compostos aromáticos pela conversão de um número par de grupos -CH= em grupos -C(=O)-, sem qualquer rearranjo de ligações duplas, incluindo análogos policíclicos e heterocíclicos” (50) (Figura 21).

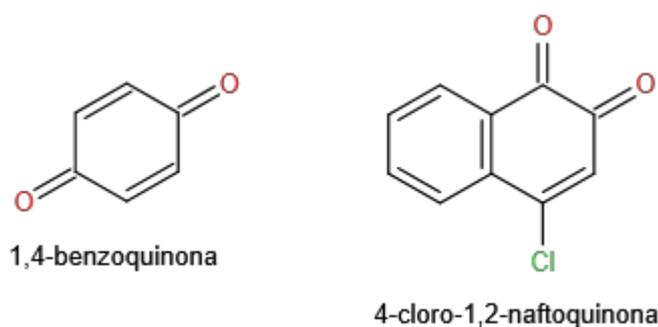


Figura 21. Exemplos de estruturas moleculares contendo a função quinona. A molécula 1,4-benzoquinona representa uma das estruturas mais simples contendo essa função

Desde a década de 1980, estudos de hepatotoxicidade do paracetamol (51,52) apontam para a formação de melaninas a partir de sistemas *in vitro*, como a associação de peroxidase alcalina e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao paracetamol, cuja detecção como melanina ocorreu por Ressonância paramagnética eletrônica (RPE ou, do inglês, *Electron Paramagnetic Resonance*, EPR). Fischer *et al* (1985a) (51) relatam ainda que o uso do sistema Peroxidase/peróxido de hidrogênio é aplicado para a formação de melaninas a partir de diversos compostos fenólicos, como tirosina e serotonina. Atualmente, sabe-se que *in vivo*, a maior parte do paracetamol metabolizada no fígado humano é convertida em compostos sem toxicidade significativa, por meio de reações de sulfonação e glucuronidação. No entanto, cerca de 10% deste paracetamol é oxidado em N-acetil-p-benzo-quinona imina (NAPQI), a qual é uma molécula tóxica, por possuir alta capacidade de oxidação em outras moléculas (53). Teoricamente, a oxidação de paracetamol em NAPQI e a alta capacidade de reações eletrofílicas de NAPQI poderia ser responsável pela reação de moléculas de NAPQI entre si e, assim, pela geração de melaninas a partir de paracetamol.

Em relação à classificação de melaninas, essas podem ser classificadas em geral entre alomelaninas, eumelaninas e feomelaninas. Alomelaninas são produzidas por bactérias,

fungos e plantas e são sintetizadas a partir de naftalenos ou catecois, além de geralmente não possuírem nitrogênio em sua composição. Eumelaninas são produzidas por animais e costumam ter tons marrons a negros. São o tipo mais estudado de melanina e cujos precursores são 5,6-dihidroxi-indol (DHI) e 5,6-dihidroxi-indol-2-Carboxílico (DHICA), Esses precursores estão arranjados em oligômeros de 13 a 20 Å e são empilhados em estruturas lamelares, com espaçamento de cerca de 4 Å. Por fim, feomelaninas costumam ter tons avermelhados e são sintetizadas a partir de benzotiazinas (54). Tanto eumelaninas quanto feomelaninas são sintetizadas a partir de L-tirosina (64). Embora exista essa classificação geral, melaninas podem absorver comprimentos de onda entre o infravermelho e o ultravioleta (54). Entre os precursores naturais de melanina, a molécula mais próxima ao paracetamol é a N-acetil-dopamina. Esse precursor é feito a partir de L-tirosina e forma eumelaninas, utilizadas por insetos para o seu processo de esclerotização, grosso modo, endurecimento de seu exoesqueleto (49).

Dada a heterogeneidade de arranjos moleculares para as moléculas de melanina, não existe consenso na literatura para quais parâmetros físico-químicos devam ser avaliados para uma molécula ser definida como tal. Entretanto, algumas propriedades são mais comumente analisadas em trabalhos de caracterização destas moléculas, tais como a insolubilidade e recalcitrância na maioria dos solventes, exceto em solventes básicos, nos quais há a quebra da cadeia de melanina; a ampla faixa de absorção de comprimentos de onda na faixa UV-vis e a detecção de radicais livres na molécula por meio de RPE (70).

Após o enriquecimento da substância marrom a partir do meio de cultura do isolado bacteriano em meio M9 suplementado com paracetamol, foram feitos testes para a caracterização desta. O primeiro teste foi o de solubilidade em diferentes solventes, cujos resultados se encontram na tabela 4. A substância marrom foi insolúvel na maioria dos solventes, com a exceção do DMSO. Na solução com o solvente de hidróxido de sódio, observou-se a mudança da solução para uma cor roxa, o que é indicativo de que houve uma reação química. Esses resultados estão em consonância com trabalhos na literatura acerca de melaninas, dada a recalcitrância dessa à maioria dos solventes (39, 56). Dessa forma, avançou-se para o uso de técnicas espectroscópicas para a caracterização da substância.

Tabela 4. Solubilidade da substância marrom em diferentes solventes.

Solvente	Solubilidade
Água deionizada	insolúvel
0,1M NaCl	insolúvel
0,4%NaOH	Reação com cor roxa

Metanol	insolúvel
Etanol	insolúvel
Isopropanol	insolúvel
2-butanol	insolúvel
Hexano	insolúvel
clorofórmio	insolúvel
DMSO	solúvel

A espectroscopia, ciência que estuda as interações entre luz e matéria, tem dado contribuições importantes para a ciência como um todo, desde a dispersão de luz visível em prisma feita por Newton à suposta detecção de fosfina na atmosfera de Vênus (72). Seja no espaço sideral ou na Terra, ensaios espectroscópicos podem ser muito informativos para se entender a composição e organização de moléculas. E com melaninas, isso não é diferente (58, 59).

No ensaio de espectroscopia em luz ultravioleta e visível, a substância marrom apresentou uma ampla faixa de absorção de luz, desde o ultravioleta próximo (~300 nm) até a luz visível correspondente a 500 nm. A partir desse comprimento, a substância teve índices de absorbância em decréscimo, até o comprimento de onda de 700nm (figura 16). Tanto uma ampla faixa de absorção de luz nessa faixa de espectro, em contraste com picos discretos de absorção de luz, quanto menores índices de absorção de luz em comprimentos de onda na luz visível, com decaimento em log são característicos de eumelaninas (54, 60) (Figura 22).

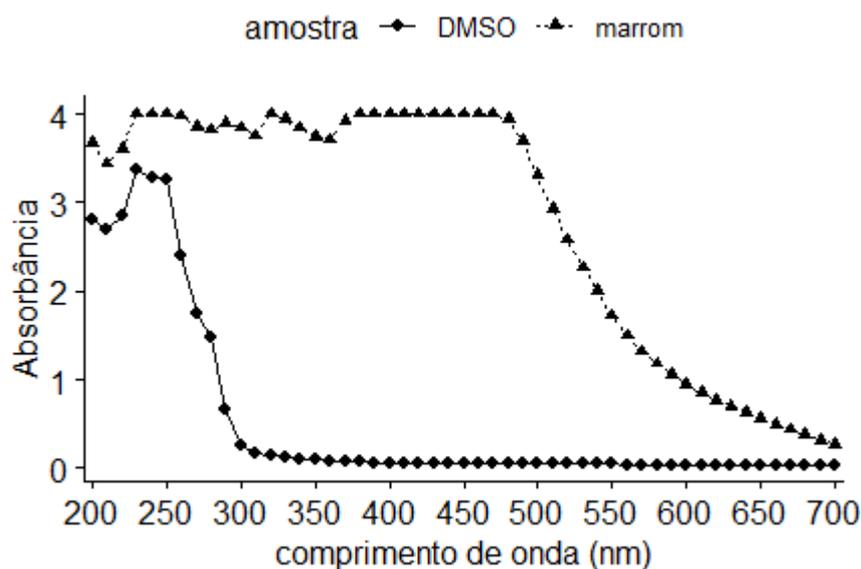


Figura 22. Espectro de absorbância de luz nas faixas de ultravioleta e visível do pigmento marrom. O controle negativo contém apenas o solvente DMSO.

Quase todas as substâncias que possuem ligações covalentes são capazes de absorver radiação eletromagnética no espectro do infravermelho. Esse processo se dá quando a frequência da radiação é a mesma das frequências vibracionais das ligações da molécula e essas possuem momento dipolo. Assim, diferentes ligações covalentes absorvem diferentes comprimentos de onda no infravermelho, por exemplo na distensão ou contorção de ligações O-H. Portanto, o FTIR (do inglês, *fourier-transformed infrared spectroscopy*) pode ser utilizado para se investigar a maioria das ligações covalentes de uma dada substância (61). Ao analisar o pigmento marrom por essa técnica, é possível notar diferentes picos de absorção (figura 23). Nesse tipo de gráfico, picos entre 1500 a 4000 cm^{-1} correspondem a região diagnóstica do espectro, onde esses picos podem ser distintamente atribuídos a determinadas ligações covalentes. Já para a picos em regiões com números de onda menores que 1500 cm^{-1} , essa interpretação é menos direta. No entanto, essa região do espectro é única para cada molécula, sendo assim chamada de região de impressão digital. Aqui, a análise do espectro se manterá a região diagnóstica. É possível observar um pico largo por volta de 3400 cm^{-1} , além de um pico discreto por volta de 3200 cm^{-1} , ambos característicos de estiramento de ligações O-H. Também são possíveis de se observar três picos, entre 1450 e 1650 cm^{-1} aproximadamente. O pico por volta de 1650 cm^{-1} pode ser atribuído a distensões em ligações C=C, embora não seja possível associar a uma ligação em cadeia alifática ou cadeia cíclica. O pico por volta de 1550 cm^{-1} pode ser atribuído a estiramento de ligações N-O, o que indicaria que a substância em questão é nitrogenada. Por fim, o pico por volta de 1450 cm^{-1} é compatível com dobramento de ligações C-H, associadas a grupos metil. Em síntese, a molécula em questão possui ligações covalentes compatíveis com a estrutura de cadeias cíclicas e insaturadas, o que por sua vez condiz com a estrutura de melaninas (39,56).

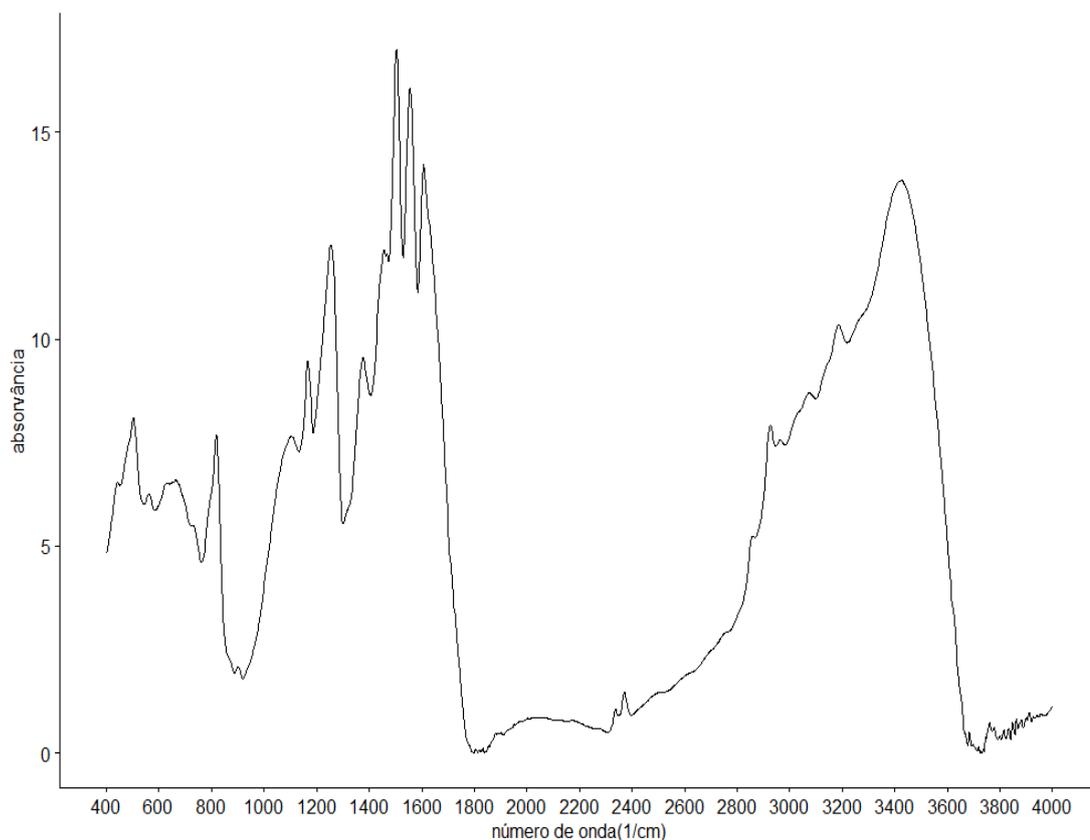


Figura 23. Espectro de absorvância de luz na faixa de infravermelho obtido a partir da análise de FTIR para o pigmento marrom.

Também foi empregado o uso da técnica de termogravimetria (TGA) (Figura 24). Nesse experimento, a massa de uma dada substância é monitorada conforme ocorre o aumento de temperatura em uma câmara atmosférica. Mudanças na massa da substância podem ser utilizadas para auxiliar na identificação dessa, uma vez que a dinâmica na composição da matéria por temperatura pode ser característica de um dado grupo de compostos químicos. Portanto, essa técnica também pode ser utilizada para a avaliação de composição de diferentes polímeros em um material plástico, por exemplo. Por fim, essa técnica também permite a avaliação da termoestabilidade de uma substância, embora essa possa mudar seu arranjo molecular com aumento de temperatura e sem mudança de massa (62). A substância apresenta perda de massa significativa apenas no intervalo de 25°C a 100°C, provavelmente devido a evaporação de moléculas de água adsorvidas (62). Se por um lado, a ausência de mudanças na massa da substância além do relatado dificulta a sua identificação, por outro é uma evidência de que a substância possui grande termoestabilidade, outra característica associada a melaninas (55). A presente molécula apresenta termoestabilidade maior que demais melaninas de origem bacteriana, as quais apresentam picos de perda de massa significativos até 600°C (78). Outros ensaios podem ser feitos

futuramente para a caracterização da substância. Em particular, está a ressonância magnética eletrônica, a qual é capaz de detectar elétrons não pareados em radicais. Esse ensaio é interessante, ao passo que melaninas possuem a propriedade incomum de possuírem tais elétrons, mas serem moléculas estáveis (54,60). Ensaio suplementares de caracterização podem envolver a microscopia eletrônica de varredura, a difração de raios X(EDX) e a caracterização de sub-unidades da molécula por espectrometria de massas (MS) ou ressonância nuclear magnética (RMN) (55). Sendo uma melanina, essa molécula possui potenciais aplicações biotecnológicas interessantes, como discutido ao final do capítulo.

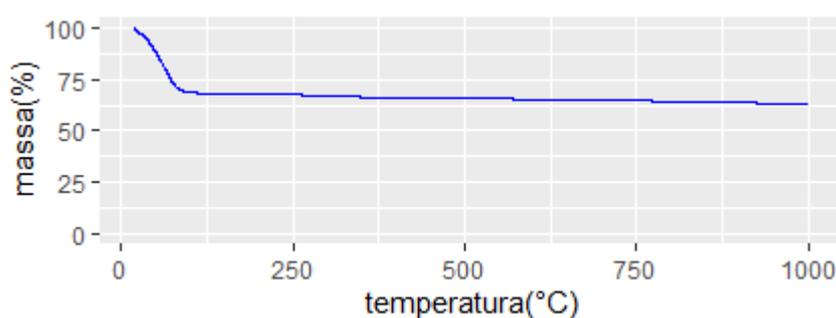


Figura 24. Curva de oscilação de massa em função de temperatura obtido para o pigmento marrom em ensaio de termogravimetria. A curva da taxa de perda de massa foi omitida, uma vez que a perda de massa se dá apenas no intervalo 25°C a 100°C, provavelmente por perda de moléculas de água.

8.5 CRESCIMENTO DO ISOLADO KPV3 EM MEIO MÍNIMO M9 CONTENDO CAFEÍNA OU PARACETAMOL

O isolado KpV3 também foi capaz de crescer em meio M9 suplementado com 500 mg.L⁻¹ de cafeína. De forma a quantificar o crescimento do isolado em meios de cultura líquidos com paracetamol ou cafeína, foi feita uma curva de crescimento por contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.Cs) a partir de culturas contendo paracetamol ou cafeína (figura 25). Uma vez que os fármacos são a única fonte de carbono e energia disponível no meio de cultura, com a premissa que o meio não recebeu fonte alguma de carbono contaminante durante o seu preparo, é possível afirmar que o isolado V3 degrada os fármacos para o seu crescimento.

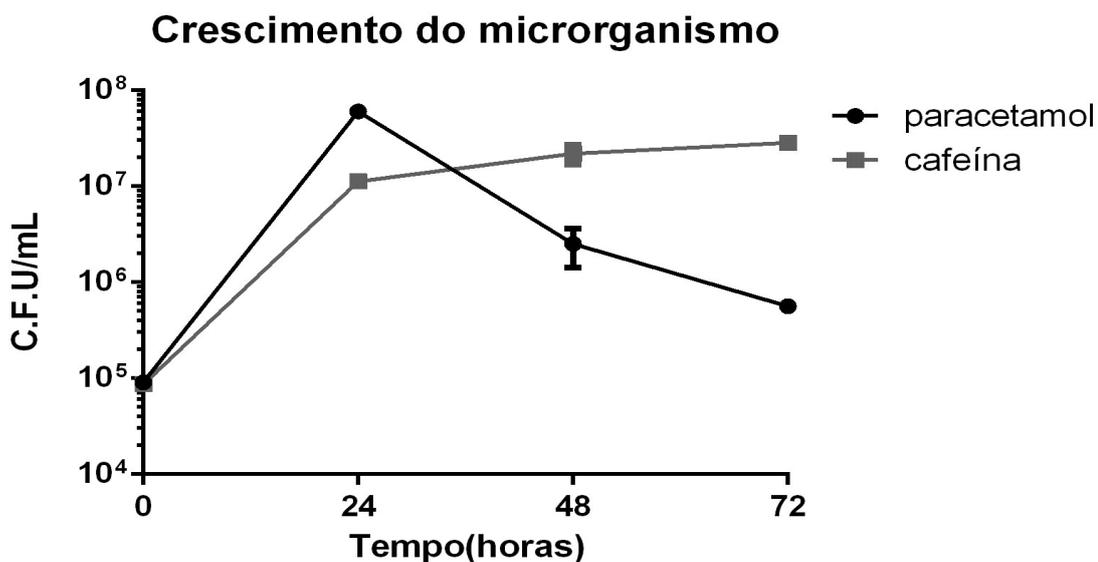


Figura 25. Curva de crescimento do isolado V3 em meio contendo apenas Paracetamol ou cafeína como fontes de carbono ao longo de 72 h.

As curvas de crescimento sugerem a degradação dos fármacos pelo microrganismo. Outras análises são necessárias para avaliar em quanto tempo a cultura do isolado V3 consegue degradar o fármaco e quais são as moléculas intermediárias de degradação. Tais técnicas podem ser cromatografia de alto desempenho acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) ou técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN)

No que diz respeito à lista de ortólogos do banco de dados KEGG, foi possível gerar visualizações para diversas vias metabólicas possíveis para o isolado V3. Na porção do KEGG dedicada ao catabolismo de moléculas aromáticas, algumas vias se destacam como potencialmente envolvidas no catabolismo de cafeína ou paracetamol. Dentre essas vias, destaca-se a via de beta-cetoadipato (Figura 26, via acima) e a via de dealquilação e monoxigenase que começa com 4-hidroximetilacetato (Figura 26, via abaixo).

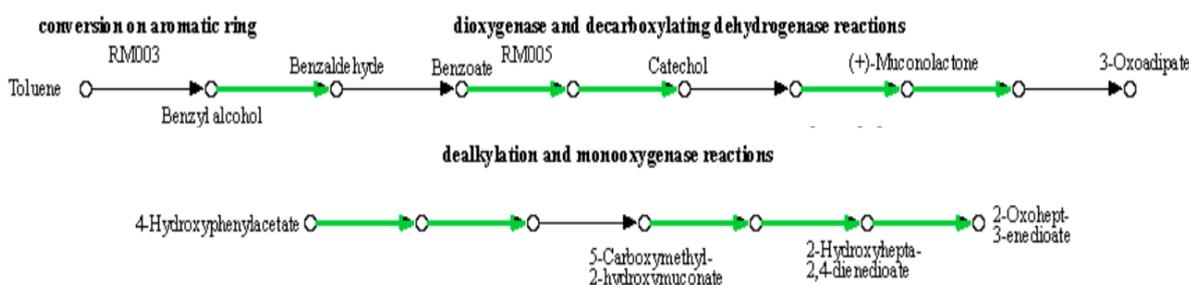


Figura 26. Principais vias bioquímicas potencialmente relacionadas à degradação de paracetamol no isolado KpV3. As setas verdes denotam genes encontrados no genoma da bactéria a partir da análise de KEGG.

A via de beta-cetoadipato, comentada em revisão por Wells and Ragauskas (2012) (79), já foi descrita para a degradação de outras moléculas xenobióticas aromáticas, tais como de fertilizantes e pesticidas. Pode ainda apresentar, em bactérias gram negativas, metabólitos intermediários já descritos para a biodegradação de paracetamol, como hidroquinona e ácido maleiacético (23).

Para a biossíntese de melaninas em bactérias, estão descritos dois precursores principais, a tirosina e o malonil-CoA. A partir da tirosina, algumas vias metabólicas distintas podem ocorrer. A tirosina pode ser hidroxilada em L-2,3-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e oxidada em o-dopaquinona por enzimas monofenol oxidase do tipo tirosinase ou difenol oxidase do tipo laccase. Ao possuir o grupo quinona, essa molécula pode sofrer autopolimerizações oxidativas, dando origem a melaninas. Outras moléculas dihidroxiladas também podem oxidar ocorrer espontaneamente, o que dá origem a quinonas e de forma que o acúmulo dessas moléculas é propício para a formação de melaninas. Também é possível para a tirosina perder o grupo amino por aminoácido aminotransferases para depois sofrer hidroxilação por diversas enzimas oxigenases, o que resulta nas moléculas 2,5-dihidroxifenilacetato (homogentisato) ou 3,4-dihidroxifenilacetato (homoprotocateato). Já para o malonil-CoA, a condensação decarboxilativa de cinco dessas moléculas pela enzima policetídeo sintase tipo 3 dá origem ao 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (THN). A condensação de duas THNs por citocromo oxidases da família P450 gera o hexahidroxiperilenoquinona, também é capaz de dar origem a melaninas (60). Também foi descrita a formação de melaninas a partir de triptofano, embora os passos reacionais não estejam elucidados (80). Na figura 26 abaixo, o primeiro passo reacional diz respeito a formação de homoprotocateato a partir de 4-hidroxifenilacetato pela enzima 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenase. O substrato natural dessa enzima, o ácido 4-hidroxifenilacético é estruturalmente similar a molécula de paracetamol, com a mudança da função ácido carboxílico desta sendo substituída pela função amida (Figura 27).

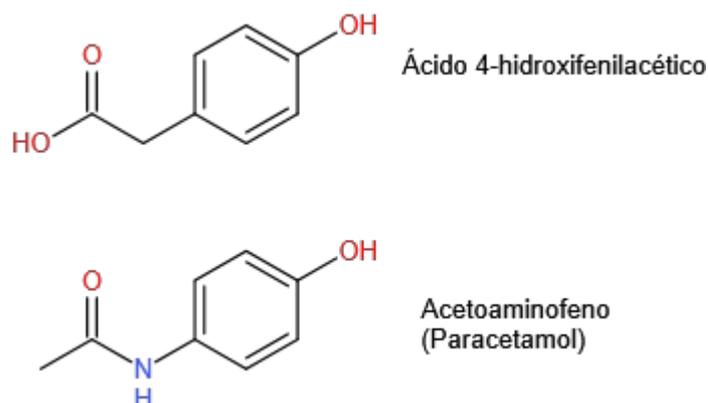


Figura 27. Estruturas moleculares do ácido 4-hidroxifenilacético e do acetoaminofeno. A mudança entre as moléculas é a substituição entre a função ácido carboxílico pela função amida. Dada a semelhança estrutural entre essas moléculas, é plausível o reconhecimento do acetoaminofeno como substrato da enzima 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilase.

A enzima 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilase já foi descrita para a espécie *K.pneumoniae* (81) e estudos da estrutura terciária dessa proteína, bem como estudos bioquímicos e de engenharia metabólica envolvendo-a demonstram a sua versatilidade quanto ao reconhecimento de diferentes substratos mono e difenólicos, como cresóis, clorofenóis, ácido p-cumárico, umbeliferona, resveratrol, L-tirosina e Levodopa (82–86) (Figura 28).

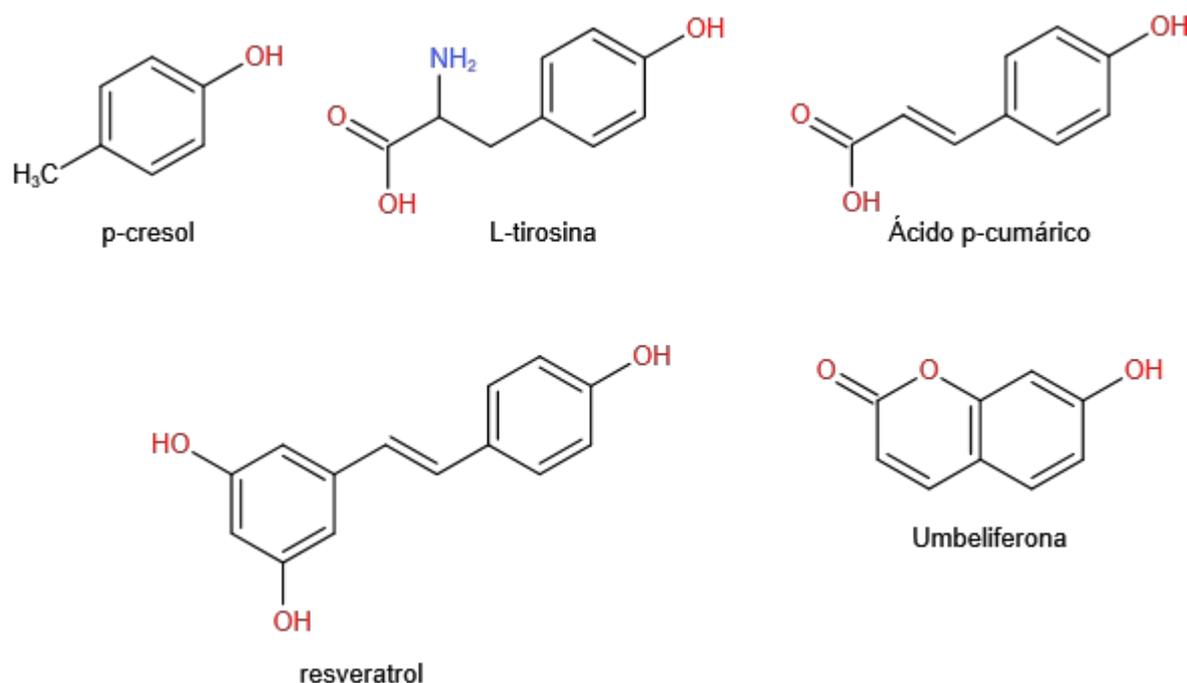


Figura 28. Exemplos de estruturas moleculares para as quais há registro como substrato da enzima 4-hidroxifenolacetato 3-hidroxilase de *E.coli*. Adaptado de Lin e Yan, 2014

A capacidade ampla desta enzima em hidroxilar cresóis e clorofenóis já foi demonstrada como útil na degradação desses poluentes em processos de bioremediação (87). Além disso, Prieto e colaboradores(82) relatam a produção de pigmentos negros ou marrons em microrganismos modificados geneticamente para a produção da enzima 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenase de *E.coli* a partir de diversos substratos, como L-tirosina, N-acetil-L-tirosina, 4-hidroxifenilacetato, 3-hidroxifenilacetato e fenol. Caso esses pigmentos sejam melaninas, como o pigmento do presente trabalho possui evidências para sê-lo, o repertório de substratos para a produção de melaninas em microrganismos torna-se consideravelmente maior do que aquele reconhecido por Pavan e colegas(75). Após busca pela sequência codificadora da enzima 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilase no cromossomo de KpV3, utilizando a sequência primária desse enzima para *E.coli* e o programa tBLASTn, observa-se que a proteína codificada no cromossomo de KpV3 possui sequência primária consideravelmente próxima a de *E.coli*, com porcentagens de cobertura e identidade entre as sequências de 98,0% e 95,9% respectivamente (Figura 29).

contig_1_segment0 contig_1:1.0-5353127.0
 Sequence ID: **Query_59759** Length: **5363457** Number of Matches: **2**

Range 1: 3307301 to 3308470 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
786 bits(2029)	0.0	Compositional matrix adjust.	374/390(96%)	383/390(98%)	0/390(0%)	+2
Query 138		FYGQFEQNARNWYTRIQETGLYFNHAI VNPPI DRHLPTDKVKD VYIKLEKETDAGIIVSG				197
Sbjct 3307301		F QFEQNARNWYTRIQETGLYFNHAI VNPPI DRH P D+VKD VYIKLEKETDAGIIVSG				3307480
Query 198		AKVVATNSAL THYNMIGFGSAQVMGENPDFALMFVAPMDADGVK LISRAS YEMVAGATGS				257
Sbjct 3307481		AKVVATNSAL THYNMIGFGSAQVMGENPDFALMFVAPMDA+GVK LISRAS YEHVAGATGS				3307660
Query 258		PYDYPLSSRFENDAILVMDNVLIPWENVLIYRDFDRCRRWTEGGFARMYPLQACVRLA				317
Sbjct 3307661		PYDYPLSSRFENDAILVMD VLI PWENVLIYRDFDRCRRWTEGGFARMYPLQACVRLA				3307840
Query 318		VKLDFITALLKKSLECTGTLEFRGVQADLGEVVAWRNFWALSDSMCSEATPWVNGAYLP				377
Sbjct 3307841		VKLDFITALLKKSLECTGTLEFRGVQADLGEVVAWRN FWALSDSMCSEATPWVNGA+LP				3308020
Query 378		DHAALQTYRVLAPMAYAKIKNIIERNVTSGLIYLPSSARDLNNPOIDQYLAKYVRGSNGM				437
Sbjct 3308021		DHAALQTYRV+APMAYAKIKNIIERNVTSGLIYLPSSARDLNNPOIDQYLAKYVRGSNGM				3308200
Query 438		DHVQRKIKLKLMDAIGSEFGGRHELVEINYSGSQDEIRLQCLRQAQNSGNMDDKMMAMVD				497
Sbjct 3308201		DHVERIKIKLKLMDAIGSEFGGRHELVEINYSGS+DEIRLQCLRQAQ+SGNMDDKMMAMVD				3308380
Query 498		RCLSEYDQDGWTVPHLHNNDDINMLDKLLK	527			
Sbjct 3308381		RCLSEYDQ+GWTVP HLHNN DINMLDKLLK				3308470

Range 2: 3306913 to 3307305 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
268 bits(685)	0.0	Compositional matrix adjust.	125/131(95%)	126/131(96%)	0/131(0%)	+1
Query 9		KPEDFRAS TQRPFTGEEY LKSLQDGREIYIYGERVKDVTTHPAFRNAAASVAQLYDALHK				68
Sbjct 3306913		KPEDFRA +RP T GEEY LKSLQDGREIYIYGERVKDVTTHPAFRNAAASVAQLYDALHK				3307092
Query 69		PEMQDSLWCWNTDTGSGGYTHKFFRVAKSADDLRQORDAIAEWSRLSYGWMGRTPDYKAAF				128
Sbjct 3307093		PEMQDSLWCWNTDTGSGGYTHKFFRVAKSADDLRQORDAIAEWSRLSYGWMGRTPDYKAAF				3307272
Query 129		GCALGANPGFY	139			
Sbjct 3307273		GCALGANP FY	3307305			

Figura 29. Alinhamento por tBLASTn entre a sequência de 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilase de *E.coli* (Número de acesso PDB6EB0) e o cromossomo de KpV3.

A enzima em *E.coli* teve sua estrutura terciária resolvida por cristalografia de raios-X em diferentes estudos(85,88). Os resíduos R113, Y117 e H155 são importantes para a formação de ligações não-covalentes e estabilização do grupo fenol nos substratos (88) e esses resíduos estão também presentes na proteína codificada por KpV3.

Ainda, é possível levantar a hipótese de quais as reações químicas ocorrem no isolado KpV3 para a formação de melanina a partir de paracetamol, embora a validação experimental por técnicas de química analítica permaneçam necessárias para sua corroboração (Figura 30).

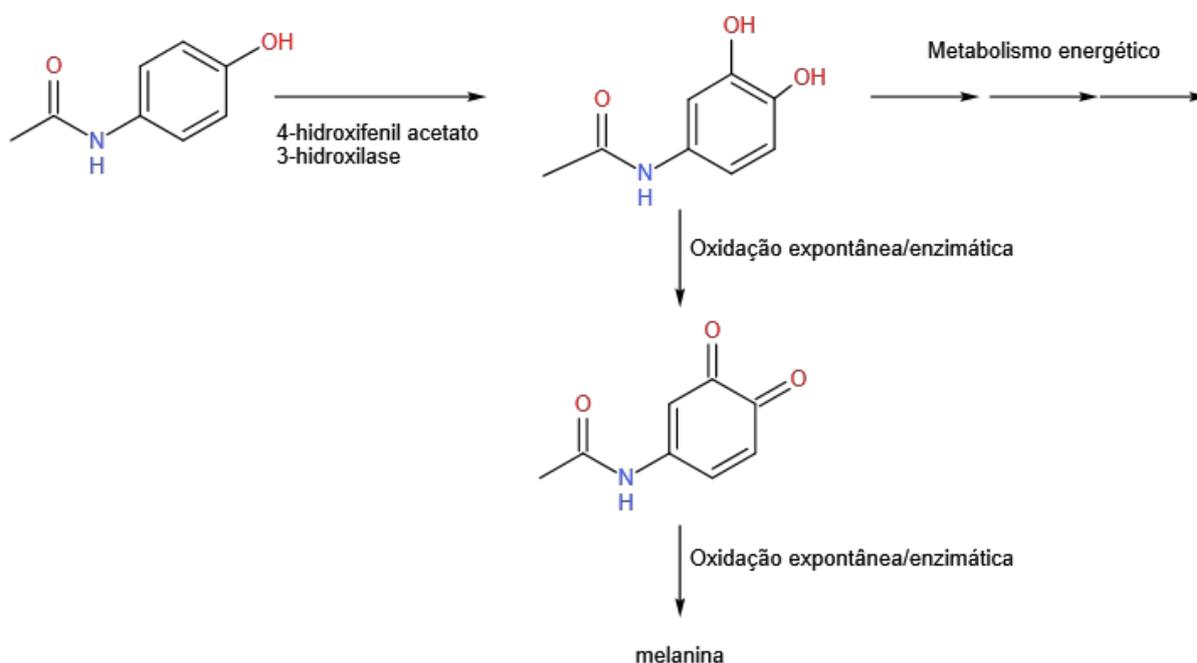


Figura 30. Desenho esquemático das reações químicas hipotéticas para a formação de melaninas a partir de paracetamol no isolado KpV3. A enzima 4-hidroxifenil acetato 3-hidroxilase permite a hidroxilação no carbono 3 do paracetamol, com esse produto se oxidando provavelmente de forma espontânea para sua quinona correspondente e essa, também mais provavelmente por reações de oxidação, promoveria auto reações para a formação de melaninas. Esse braço de reações pode ser possível dada a baixa velocidade de reação da molécula dihidroxilada nos passos reacionais seguintes para o metabolismo bacteriano, como a fissão do anel aromático por quebra oxigenolítica por oxigenases.

Também estão presentes vias de degradação de xilenos, trans-cinamatos e fenilpropanoatos. A ausência de alguns genes ao se observar as vias de forma completa pode ser resultado de variantes de base única ou artefatos do sequenciamento de nanoporos, os quais diminuiriam a similaridade desses genes com os depositados em bancos, dificultando

sua identificação. Ou, podem realmente indicar a ausência destes genes no isolado. Apesar das semelhanças entre moléculas intermediárias na formação de melaninas e degradação de paracetamol descritos na literatura ou a presença de genes de formação de melaninas presentes no isolado bacteriano, mais ensaios são necessários para se elucidar as vias de degradação de paracetamol e formação de melaninas, como por exemplo a formação de linhagens nocaute para genes de interesse. De todo modo, o paracetamol pode ser um precursor novo para a formação de melaninas a partir de bactérias e o primeiro xenobiótico a agir como tal.

A melanina possui aplicações biotecnológicas interessantes. É uma molécula capaz de auxiliar na proteção contra raios ultravioleta, dada a absorção desses e irradiação da energia em calor. Também é capaz de possuir atividade antioxidativa, uma vez que possui elétrons não-pareados que podem reagir com espécies reativas. A presença de grupos hidroxila em diferentes orientações espaciais faz com que melaninas sejam capazes de fazer ligações de coordenação com metais pesados e ter interações não-covalentes com poluentes orgânicos (60). De tal sorte, fungos com alta capacidade de melanização são encontrados em regiões com altos índices de radiação como Chernobyl (59) e animais que vivem em ambientes altamente poluídos tendem a produzir mais melanina, fenômeno conhecido como melanização industrial (81). Caso se confirme esse processo de conversão de paracetamol em melanina, seria possível a geração de um composto com capacidade de adsorção de poluentes a partir de um poluente, o que poderia ser considerado como uma forma de biorremediação em uma segunda ordem. Tal processo talvez possa contribuir para a geração de biofiltros na associação de bactérias com carvões ativados.

9 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1

Foi possível o isolamento e identificação de uma bactéria nativa de ambiente aquático para a potencial degradação de xenobióticos poluentes. Essa bactéria se mostrou capaz de colonizar a superfície de carvão desenvolvido para adsorção de cafeína e paracetamol.

O isolado KpV3 foi identificado como da espécie *K. pneumoniae* e essa linhagem apresentou a produção de um pigmento marrom quando na presença de paracetamol. Esse pigmento possui características de melanina e provavelmente ocorre como produto de degradação do fármaco, o que pode propiciar aplicações biotecnológicas.

Diferentes genes e vias metabólicas puderam ser encontradas, pelo menos de forma parcial, que podem estar relacionadas ao catabolismo de paracetamol, como as vias de beta-cetoadipato, via contendo 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenase e, vias de degradação de xilenos, trans-cinamatos e fenilpropanoatos.

Dadas as características de interesse médico do isolado (discutidas no capítulo 2), bem como a ausência de parâmetros otimizados (temperatura, inóculo, pH, dentre outros) para degradação dos fármacos de interesse, o uso da cepa V3 em associação com carvões ativados para a remoção de poluentes pode ser feita no máximo como prova de conceito, com uma nova prospecção de microrganismos sendo de interesse para, ao menos, a aplicação de bactérias em associação com carvões para remoção de poluentes.

**CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE MÉDICO
DO ISOLADO KPV3**

10 RESUMO DO CAPÍTULO 2

Apesar dos registros na literatura acerca da aplicação de *Klebsiella* para fins tecnológicos, o gênero foi descrito originalmente como capaz de causar doenças de forma oportunística. Estudos do genoma desse gênero tem reavaliado a descrição de suas espécies. Dessa forma, análises genômicas se tornaram a principal forma de identificação de espécies do gênero. Além da patogenicidade descrita originalmente para a espécie, dois fenótipos têm sido observados com cada vez mais frequência para *K. pneumoniae*: A multirresistência a antimicrobianos e a hipervirulência, essa última sendo a capacidade de causar doenças em humanos sem morbidades. Assim sendo, embora não tenha sido o objeto inicial de estudo, a melhor compreensão dos fatores de patogenicidade da linhagem KpV3 podem melhor auxiliar estudos futuros de epidemiologia para a espécie no Distrito Federal, dado o seu local de isolamento. Ensaio de antibiograma demonstra que a linhagem referida é multirresistente a antimicrobianos, incluindo cefalosporinas, carbapenems e quinolonas. Análises genômicas da linhagem a apontam como uma nova linhagem para a espécie, sendo seu número de linhagem tipo depositada em banco de dados da espécie. A árvore filogenética construída a partir de genomas de *K. pneumoniae* depositadas em *Genbank* e com valores de ANI>99%. O genoma da linhagem possui genes de virulência típicos para a espécie, como genes para a produção de cápsula, fímbrias, lipopolissacarídeo e o sideróforo enterobactina. Também foi encontrada a maioria dos genes responsáveis pela estrutura do sistema de secreção tipo 6, além de três genes codificadores das toxinas VgrG, as quais podem desempenhar um papel na competição da bactéria contra outras bactérias ou fungos em ambientes diversos. No entanto, praticamente não foram encontrados genes relacionados à hipervirulência. Em conformidade com o ensaio de antibiograma, foram encontrados genes de resistência a beta-lactâmicos, além de genes codificadores de bombas de efluxo e genes para a resistência contra acriflavina e metais pesados. Dentre esses genes, destaca-se a ocorrência do gene *blaCTX-M-15*, o qual codifica uma enzima de beta-lactamase de espectro estendido. Esse gene foi encontrado no cromossomo bacteriano próximo a uma sequência de profago de *Siphoviridae*. Isso indica que a linhagem KpV3 esteve em algum momento de sua ancestralidade em contato com microbiota intestinal de mamíferos. Esse contato pode ocorrer dentro de algum mamífero propriamente dito ou em efluente de esgoto. Também foi encontrado o gene *blaKPC-2* em um

contig extracromossomal, em associação com um transposon do tipo NTEKPC não descrito na literatura. Por fim, um *contig* da linhagem KpV3 teve correspondência de quase 100% com *contigs* de uma linhagem hospitalar de *K. pneumoniae*, o que indica um possível fluxo de genes entre hospitais do DF e o Lago Paranoá. Essa descoberta é alarmante, uma vez que o lago é de usufruto da população local para fins de lazer, bem como reuso de água para potabilidade. No entanto, o estudo de mais isolados é necessário para se examinar qual a potencial dispersão de linhagens de relevância médica no Lago Paranoá. Também é importante destacar que o reuso de água em cenários de secas prolongadas pelo aquecimento global pode contribuir para a disseminação de linhagens resistentes a antimicrobianos.

11 INTRODUÇÃO

11.1 *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

O gênero *Klebsiella* foi nomeado em 1885 por Trevisan (apud (51)), em homenagem a Edwin Klebs, quem descreveu a espécie hoje conhecida como *Corynebacterium diptheriae* (83). Neste trabalho, Trevisan descreve a espécie tipo do gênero, *K. pneumoniae*, isolada a partir de pacientes com pneumonia. Essa espécie possui como características gerais ser um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, imóvel e produtor de cápsula mucoide. Na época e por décadas seguintes, os critérios para classificação dos microrganismos eram majoritariamente morfológicos e bioquímicos. Assim, era difícil a distinção entre *K. pneumoniae* e a bactéria descrita por Escherich como “*Bacterium lactis aerogenes*”, hoje espécie descrita como *K. aerogenes*, uma vez que ambas as espécies possuíam perfis de fermentação de açúcares similar, bem como reagiam positivamente em ensaios de soro anti-cápsula de *Klebsiella* (51). A separação dessas espécies começou a se consolidar a partir de Møller (apud (51)), o qual introduziu testes de descarboxilase, onde *K. pneumoniae* era negativa para descarboxilação de ornitina e motilidade e *K. aerogenes* era positiva para descarboxilação e poderia apresentar resultado positivo para motilidade. Também era questionada a separação entre *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, essa última positiva para testes de indol. No entanto, testes genéticos demonstram a separação dessas espécies (51).

Curiosamente, as análises de genoma de diversas linhagens anteriormente pertencentes a *K. pneumoniae* as tem revelado como de espécies distintas, em anos mais recentes. Em 2004, Rosenblueth e colaboradores (64) descrevem *K. variicola* (epíteto que denota “habitante de lugares diversos”), uma espécie isolada a partir de pacientes internados em hospitais e de plantas, incapaz de fermentar adonitol e com hibridização DNA-DNA menor que 70% para *K. pneumoniae*, critério esse como um dos utilizados para a delimitação de novas espécies bacterianas. Duas doenças associadas ao gênero, o rinoscleroma e a rinite atrófica, eram reconhecidas como causadas por duas espécies distintas, mas que desde 2009, são reconhecidas como subespécies de *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* e *K. pneumoniae* subsp. *ozanae*, respectivamente (83). Em 2014, Brisse e colaboradores (84) descrevem *K. quasipneumoniae*, espécie essa cujo genoma possui 94% de ANI (identidade

média de nucleotídeos, do inglês, *average nucleotide identity*) com *K. pneumoniae* e *K. varicola*, de tal sorte que índices <95% são utilizados como critério para descrição de novas espécies. Em 2017, Long e colaboradores (85) descrevem uma linhagem cujos polimorfismos de base única delimitam sua existência como um ramo separado das demais espécies de *Klebsiella* em cladogramas, sendo essa espécie então descrita como *K. quasivariicola*. Por fim, Rodrigues e colaboradores descrevem em 2019 *K. africana* (65), com valor de ANI<95% para as demais espécies de *Klebsiella*. Wyres e colaboradores (87) se referem às espécies descritas nesse parágrafo como “complexo de espécies *K. pneumoniae*”. Esse complexo não tem valor filogenético formal, porém é utilizado, pois ensaios bioquímicos não são capazes de discernir entre essas espécies, com análises genéticas, como MLST, e genômicas sendo assim mais adequadas para identificação, tais como ANI. Identificação por proteômica é teoricamente possível, no entanto é necessário preparar os perfis proteicos de identificação por cada laboratório, uma vez que esses não se encontram disponíveis ainda em bancos de dados públicos ou comerciais (50). Wyres e colaboradores (87) ressaltam ainda que *K. pneumoniae* é a espécie predominante do grupo em coleções clínicas e para qual se conhece mais acerca de sua patogenicidade em relação às demais espécies do gênero.

Desde a descrição da espécie por Trevisan, *K. pneumoniae* está associada a infecções oportunistas em humanos (67, 86). Nesse tipo de infecção, onde as cepas bacterianas são referidas como “clássicas” pela literatura (do inglês, *classic Klebsiella pneumoniae*, cKp), as manifestações clínicas se dão principalmente na forma de pneumonias, infecções do trato urinário ou infecções por feridas, todas as quais podem evoluir para septicemias. Estas infecções ocorrem em ambientes nosocomiais e pacientes de risco incluem recém-nascidos, idosos, convalescentes de cirurgias e portadores de imunodeficiências. Para esses pacientes, é possível que as infecções ocorram pelo controle ineficiente do sistema imune em prevenir crescimento exacerbado destas bactérias. Isso se dá pois embora *K. pneumoniae* possa ser um membro comensal da microbiota intestinal, sua colonização no intestino aumenta as chances de um dado portador desenvolver uma infecção (86).

Após aproximadamente 100 anos da descrição de Trevisan, dois fenótipos emergentes começaram a ser descritos para cepas de *K. pneumoniae*, com repercussões clínicas importantes: As cepas de *K. pneumoniae* ditas “hipervirulentas” (do inglês, *hypervirulent Klebsiella pneumoniae*, HVkp) e cepas da espécie resistentes a antimicrobianos carbapenêmicos (do inglês, *Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae* CRkp), comumente associadas com fenótipo de multiresistência a antimicrobianos (87, 88). As descrições moleculares de como se constituem esses fenótipos ocorrem nas sessões seguintes. No

entanto, as características gerais desses fenótipos e sua associação com linhagens específicas ocorre a seguir.

Wyres e colaboradores (86) classificam cepas HVkps como patógenos “verdadeiros”, diante da possibilidade de infecção dessas cepas em pessoas sem comorbidades aparentes. Essas infecções também passam a ocorrer fora dos hospitais, de origem dita comunitária. Para infecções por HVkps, manifestações clínicas comuns são endoftalmite, pneumonias, fascite necrosante, meningite, abscesso piogênico do fígado, dentre outras. A maioria desses locais de infecção, podendo ocorrer simultaneamente, são raras para cKps e isso se deve à capacidade de HVkps promoverem infecções metastáticas. Isso significa a capacidade das bactérias de sobreviver na circulação sanguínea do hospedeiro e colonizar locais secundários para promoção de infecção. Linhagens específicas da espécie estão relacionadas ao fenótipo de hipervirulência, notadamente o grupo clonal 23, o que inclui tipos clonais (do inglês, Strain type, STs) ST23, ST 26, ST 57 e ST 163 (90). Já linhagens CRkp, para as quais há poucas opções quimioterápicas, podem ser encontradas em diversas linhagens diferentes, uma vez que os genes que permitem o surgimento deste fenótipo são frequentemente mobilizados por transmissão horizontal de genes, fenômeno detalhado em sessão seguinte. No entanto, linhagens dos grupos clonais CG 258 (incluindo STs 258, 11 e 512), CG 15 (incluindo STs 15 e 14), além das STs 147, 37, 101 e 17 são as mais comuns em surtos envolvendo *K. pneumoniae* multiresistentes (89). Por fim, um fenômeno particularmente preocupante que tem sido relatado é a convergência dos fenótipos de hipervirulência e de multiresistência a antimicrobianos para uma mesma linhagem de *K. pneumoniae*. Essa convergência pode se dar quando uma bactéria HVkp recebe genes de resistência a antimicrobianos por transmissão horizontal de genes ou o contrário ou ainda quando genes relativos a ambos os fenótipos acabam por integrar um mesmo elemento genético móvel, como um plasmídeo. Até o momento, a maioria destes casos de convergência de fenótipos tem ocorrido na Ásia, mas a severidade de casos clínicos causados por bactérias com convergência desses fenótipos torna importante o rastreamento dessas linhagens em ambientes hospitalares e na comunidade (87).

11.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Durante seu discurso de posse do prêmio nobel de medicina ou fisiologia em 1945, Alexander Fleming advertia (90): “Se você usa penicilina, use o suficiente”. Essa advertência se dava às vistas de tanto o uso amplo do antibiótico pelas tropas aliadas na segunda guerra mundial, quanto pelas observações de Fleming, que observara a emergência de bactérias resistentes a penicilina em laboratório, caso essas fossem expostas a concentrações sub-inibitórias. Nas décadas seguintes, até a década de 1980, novas classes de antimicrobianos foram descobertas e comercializadas, como aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, dentre outros (92).

No entanto, poucos anos após a introdução de um novo antimicrobiano em regimes terapêuticos, surgiam relatos de isolados bacterianos resistentes a cada um (92). Genes de resistência a antibióticos já existiam antes de qualquer interferência humana, uma vez que esses eram empregados por microrganismos em dinâmicas de competição por nichos ambientais (92). No entanto, com o uso inadequado de antibióticos em diferentes esferas, a mobilização desses genes a linhagens patogênicas humanas, o que será melhor discutido na próxima sessão. Pior, a resistência a antimicrobianos se dá como um problema global atualmente (93, 94). Para se entender como a resistência a antimicrobianos emerge e se dissemina pelo planeta, um conceito útil é o de saúde única. Esse conceito foi cunhado em 2004 para denotar a dependência da saúde humana em relação a saúde dos demais animais, domésticos ou selvagens, e em relação a “saúde” do meio ambiente (96). Sob esse conceito, diferentes entidades de saúde humana, veterinária e ambiental se unem para fomentar discussões e elaborar estudos sobre a dependência dessas esferas (<https://onehealthinitiative.com/>). Para Robinson e colegas (96), a resistência a antimicrobianos é o problema de saúde única mais típico. Como Baquero e colaboradores (98) discutem, diferentes ações antrópicas tem elevado o contato de microbiotas humanas com microbiotas ambientais, bem como a seleção nestas pelo fenótipo de resistência a antimicrobianos, seja por mutações ou por transferência horizontal de genes e sua seleção em ambientes com concentrações relevantes de antimicrobianos. Ainda segundo os autores, a interação entre microbiomas humanos e de outros animais aumentou progressivamente, das caças ao período neolítico, com a geração da agropecuária, e até o contexto atual, com aumento nas populações humanas e de consumo de proteína animal gerada de forma intensiva e pouco higienizada. Um exemplo prático desse contexto foi a emergência do gene de

resistência *mcr-1* a colistina. Esse é um antimicrobiano de último recurso e a primeira detecção de sua mobilização ocorreu em plasmídeos de linhagens de *E. coli*, as quais eram carregadas de porcos a humanos, uma vez que o uso do antimicrobiano era controlado apenas em humanos (99). Também se destaca o estudo de metagenomas microbianos associados a cálculos dentários de ursos pardos na Suécia, onde a ocorrência de genes de resistência nesses ambientes aumenta no período de aumento do consumo de antimicrobianos no país e diminui quando medidas estatais restringem o uso destes. Os autores também não encontram uma correlação entre proximidade destes animais com populações humanas e ocorrência de genes de resistência a antimicrobianos, o que indica para a disseminação desses genes em ambientes selvagens (99). Há ainda o caso para a disseminação de genes *blaCTX* dentre enterobactérias. Originalmente, essa família de genes era encontrada em bactérias do gênero *Kluyvera*. Um dos fatores que contribuiu para a disseminação dos genes *blaCTX* a partir desse gênero para enterobactérias foi a inserção de promotores mais fortes acima desses genes, por sequências de inserção, de forma que as linhagens receptoras desses pudessem ter doses de MIC (do inglês, *minimum inhibitory concentration*) maiores e se tornassem resistentes. Em experimentos *in vitro* em *Kluyvera*, a mobilização da sequência *ISEcp1B* carregando genes *blaCTX* do cromossomo para plasmídeos ocorreu de forma mais frequente em situações de presença de cefalosporinas e em temperaturas próximas a 40°C, em comparação à condição controle de 37°C. Dessa forma, a presença desses antimicrobianos no ambiente ou a ocorrência dessa sequência em microbiotas de aves, de temperatura corporal próxima à relatada, poderia acelerar a disseminação desses genes de resistência (100, 101). O despejo descontrolado de antimicrobianos, seja de ambientes hospitalares ou domiciliares, a falta de sua erradicação em sistemas de tratamento de água e esgoto também contribuem para este problema (94). Nadimpalli e colegas (102) discutem ainda como a resistência a antimicrobianos afeta de forma desproporcional países e contextos locais de baixa renda, onde assentamentos urbanos informais propiciam de forma mais intensa a disseminação de resistência a antimicrobianos. Nestes contextos, densidades populacionais humanas e animais altas, aliadas a falta de saneamento e exposição a material fecal, catalisam a transmissão de resistência a antimicrobianos entre as microbiotas locais. Isso se torna mais grave ao se considerar que são afetadas populações as quais já possuem acesso restrito a práticas preventivas de saúde. Assim sendo, a vigilância sobre a ocorrência de resistência a antimicrobianos, bem como práticas para o combate dessa, se fazem importantes a nível global e, particularmente, em comunidades socio-econômicas mais vulnerabilizadas.

Sucintamente, em termos moléculares, a resistência a antimicrobianos se dá por meio da alteração de vias metabólicas pré-existentes, a modificação por ligações covalentes ou quebras nas moléculas de antimicrobianos, a restrição de acesso dos antimicrobianos ao interior celular bacteriano, a modificação molecular dos alvos dos antimicrobianos e a expulsão destes de dentro das células bacterianas (104). Exemplos desses mecanismos serão discutidos adiante com foco na espécie *K. pneumoniae*.

No relatório “Ameaças da resistência a antimicrobianos nos Estados Unidos” de 2019, o Centro de Controle de Doenças e prevenção (do inglês, CDC) (103), elenca diferentes grupos de bactérias, e a espécie fúngica *Candida auris*, dentre os grupos de “ameaças urgentes”, “ameaças sérias”, “ameaças de preocupação” e “lista de vigilância”. Essa classificação, em ordem decrescente de periculosidade, se dá em consideração a impactos clínicos e econômicos, bem como sua incidência na época e projetada para dez anos, transmissibilidade, disponibilidade de antimicrobianos efetivos e barreiras de prevenção. Dentre as ameaças urgentes, está o grupo das enterobactérias resistentes a carbapenems, para as quais o relatório dá a alcunha de “bactérias do pesadelo”. Para esse grupo de bactérias, há poucas opções terapêuticas, como o antimicrobiano colistina, o qual é altamente nefro e neurotóxico, e o uso de bacteriófagos, os quais são utilizados em regimes experimentais ou uso compassivo no hemisfério ocidental ou ainda terapias de combinação de antibacterianos e/ou bacteriófagos (104). Nesse grupo de bactérias, se encontram as *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems. Para essa espécie, as principais classes de antibacterianos utilizados são os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, polimixinas e tigeciclina (88). Dada a importância do fenótipo de resistência a antimicrobianos para a espécie, estas classes e os mecanismos de resistência descritos para *K. pneumoniae* serão descritos a seguir.

Antibacterianos do grupo dos beta-lactâmicos são os mais utilizados atualmente e seu consumo global aumentou em 36 % entre 2000 e 2015 (106), além de serem os antibacterianos preferenciais para o tratamento de infecções causadas por enterobactérias (103). Esse grupo pode ser dividido entre quatro classes químicas: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenems. Todos os componentes do grupo possuem o anel beta-lactâmico, o qual é constituído por um grupo amida cíclico (3-carbono, 1-nitrogênio) (106–108). Esse anel é capaz de causar a acilação da enzima transpeptidase (também conhecida como proteína ligante a penicilina, do inglês, *penicillin binding protein*, PBP), o que a inativa. Essa enzima é utilizada por bactérias para ligar peptídeos na parede celular. Assim, a parede celular perde a sua integridade, de forma a promover a lise da célula bacteriana (109). As penicilinas possuem um anel de tiazolidina ((CH₂)₃(NH)S)) fusionado ao anel beta-lactâmico;

as cefalosporinas possuem um anel de dihidrotiazina (C_4H_7NS) no lugar do anel de tiazolidina; os monobactâmicos, como o nome indica, possuem apenas o anel beta-lactâmico e nos carbapenêmicos, o átomo de enxofre da posição 1 da tiazolidina é substituído por um átomo de carbono, além da introdução de uma insaturação no anel de tiazolidina (107,108). Em associação com esses antibacterianos, podem ser administrados inibidores de beta-lactamase, como os inibidores de ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam e avibactam (109) (Figura 31).

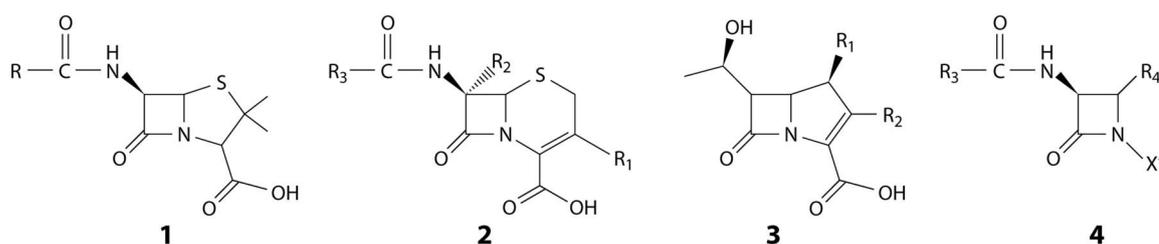


Figura 31. Estruturas moleculares de moléculas representativas dos principais beta-lactâmicos. 1 - estrutura da penicilina. 2- estrutura básica de cefalosporina. 3- estrutura básica de carbapenem. 4- estrutura básica de monobactâmico. Retirado de Bush e Bradford, 2020.

Na espécie *K. pneumoniae*, virtualmente todas as linhagens possuem resistência às penicilinas, por meio da expressão do gene de beta-lactamase *blashv*, localizado no cromossomo bacteriano (86). Tal é essa disseminação do gene *blashv* na espécie que se usa ampicilina para o isolamento de cepas de *K. pneumoniae* a partir de amostras de fezes humanas (dx.doi.org/10.17504/protocols.io.662hhge). Algumas linhagens dessa espécie possuem mutações pontuais neste gene, de forma que essa passa a conferir resistência de forma estendida a beta-lactâmicos, assim incluindo penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas (86, 88). Tais mutações deram origem a primeira beta-lactamase de espectro estendido, formando o gene *blashv-2*, encontrado em uma linhagem de *K. pneumoniae* isolada a partir de um paciente em unidade de terapia intensiva na Alemanha (109). Mutações no promotor de alelos *blashv* capazes de conceder resistência a cefalosporinas, de forma a aumentar a força desses promotores, podem resultar na resistência até de beta-lactâmicos de última geração, como os carbapenems. Além deste gene, cromossomos de *K. pneumoniae* apresentam genes de bombas de efluxo *oqxAB* e *acrAB*, os quais podem apresentar mutações em algumas linhagens para o bombeamento de carbapenems, além de mutações nos genes de porina *OmpK35* e *OmpK36* ou ainda a deleção destes, que dificultam a difusão dos antibacterianos da membrana periplasmática a parede celular (86).

Em relação às ESBLs, durante as décadas de 1990-2000, alelos dos genes *blashv* e *blatem* foram os principais responsáveis genes do grupo. No entanto, a partir da década de 2000, cepas responsáveis por surtos hospitalares passaram a apresentar ESBLs da família *CTX-M*, com a ocorrência de outros genes, como *ges*, *veb* e *oxa* (88, 100). A primeira detecção dessa família de genes se deu em um isolado de *E. coli* resistente a cefatoxima em um caso de otite infantil na cidade de Munique, assim gerando o nome CTX-M. Nessa família, os genes *CTX-M-14* e *CTX-M-15* são os de maior distribuição, com ocorrências em humanos, animais e amostras aquáticas pelo globo (101).

Em face dos casos de resistência a até cefalosporinas, como última linha de defesa dessa classe de antibacterianos, foram desenvolvidas e aplicadas os carbapenems em 1983. No entanto, já em 1987, Knothe e colaboradores (110) detectaram cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems e, em 1991, o primeiro gene de carbapenemase foi detectado, *IMP-1* (96). Desde então, diferentes genes de carbapenemase foram descobertos, com alguns sendo detectados pela primeira vez em *K. pneumoniae*, como *OXA*, *NDM* e *KPC* (88, 111). Essa última família de genes é a de maior distribuição dentre as carbapenemases para a espécie, tanto pela associação com linhagens ST 258, quanto pela transmissão horizontal promovida por transposons *Tn4401* ou derivados, com os genes *KPC-1* e *KPC-2* sendo os mais frequentes em surtos hospitalares (Figura 32) (88, 112).

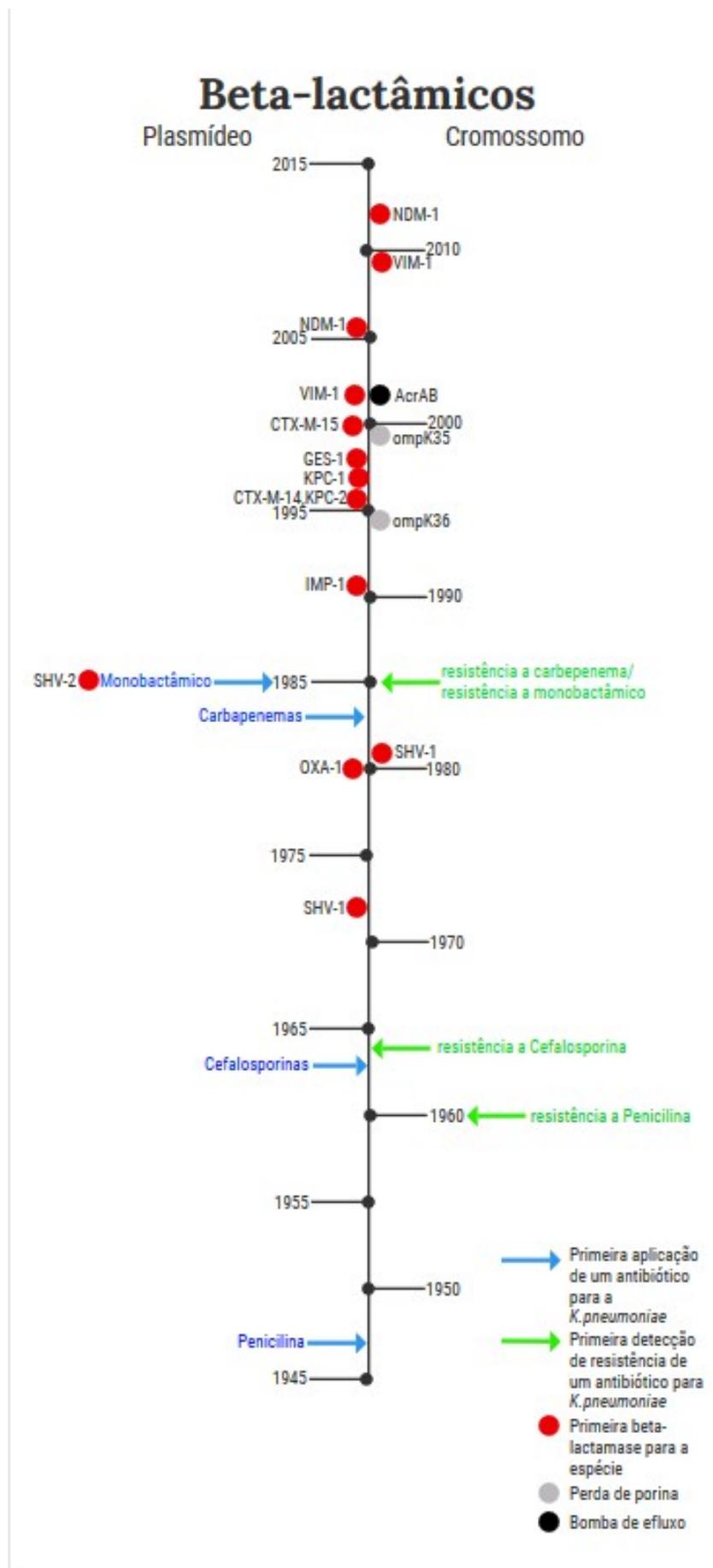


Figura 32. Linha do tempo do uso de beta-lactâmicos e aquisição de resistência em *K. pneumoniae*. Adaptado de Navon-Vanezia *et al*, 2017.

Já os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos utilizada desde 1944, como a estreptomicina, e cujo mecanismo de ação se dá na interação desses com a porção do sítio A da sub-unidade 30S do ribossomo. Nessa interação, a conformação do sítio muda de tal forma a alterar o processo de tradução celular, induzindo erros no reconhecimento códon-anticódon ou ainda promovendo a leitura de códons de parada precoces em fitas de RNA mensageiro. Esses antibióticos foram sendo menos utilizados a partir da década de 1980, em favor de cefalosporinas, carbapenems e fluoroquinolonas, por serem consideradas de espectro mais amplo e/ou mais seguras. No entanto, o surgimento de resistência a esses antibióticos em várias espécies de bactérias gram-negativas fez aumentar o uso de aminoglicosídeos de novo, o que repercutiu nas formas de resistência a esse (114).

Entre as décadas de 1970 e 1980, os genes de resistência a aminoglicosídeos para *K. pneumoniae* consistiam basicamente naquelas cujas enzimas modificavam a estrutura do antibiótico, como acetiltransferases, adenililtransferases e fosfotransferases. Essas enzimas, ao atuarem na estrutura do aminoglicosídeo, possuíam a tendência a serem específicas a um grupo restrito de formas dessa classe de antibiótico. Após a intensificação no uso de aminoglicosídeos, começaram a ser detectados na década de 2000 genes que codificavam metilases cujo alvo era o RNA 16S. Dessa vez, ao atuar sobre um sítio de interação dos fármacos, a resistência se dava de forma mais ampla a classe dos aminoglicosídeos. Também passaram a ser observadas mutações em genes de bombas de efluxo, como *acrAB*, bem como em deleções do gene de porina *kpnO* (89) (Figura 33).

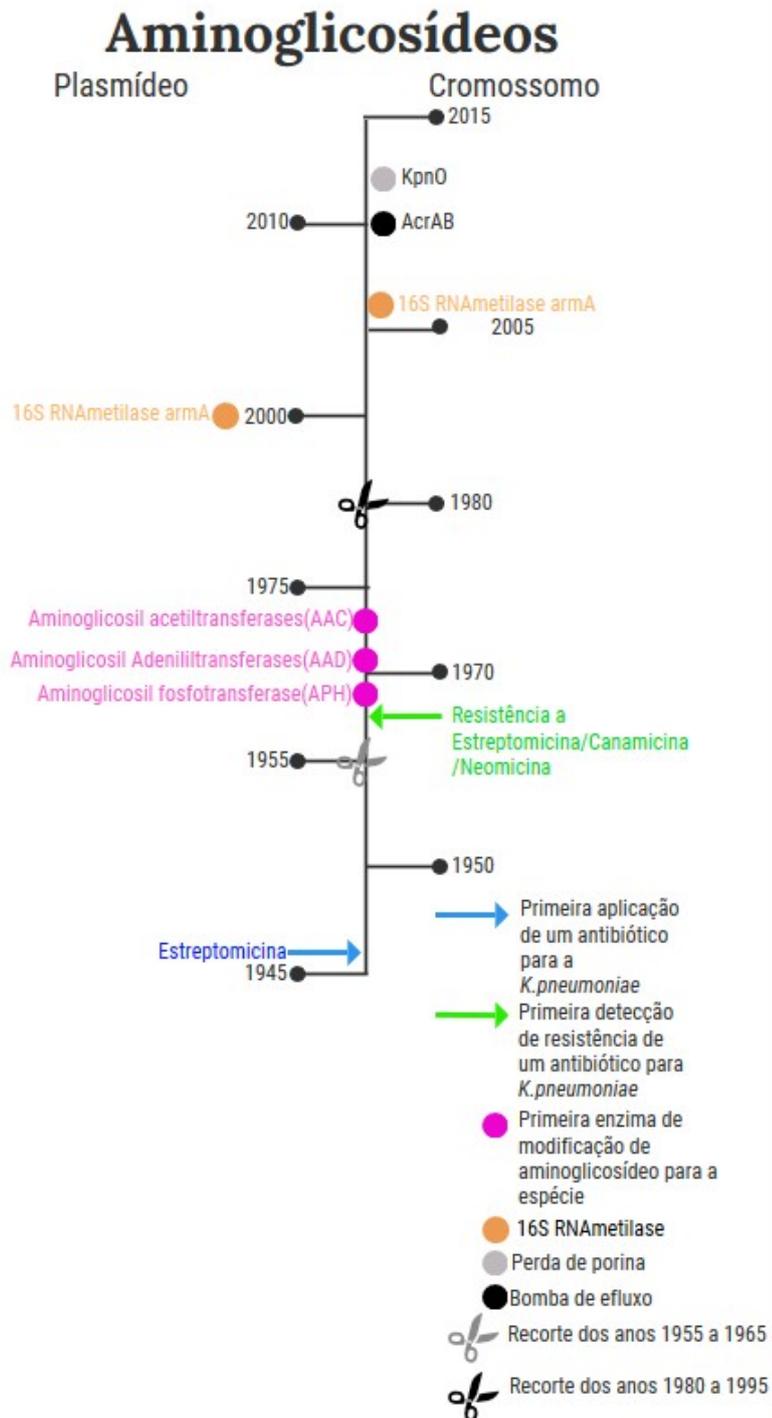


Figura 33. Linha do tempo do uso de aminoglicosídeos e aquisição de resistência em *K. pneumoniae*. Adaptado de Navon-Vanezia *et al*, 2017.

Quinolonas, por sua vez, são uma classe de antibióticos que atua sobre a família de enzimas das DNA topoisomerasas, de forma a impedir o relaxamento topológico gerado sobre o DNA por conta da enzima DNA helicase. Como consequência, o DNA acumula tensão tal

que impede a abertura contínua da forquilha de replicação sobre este, comprometendo assim a replicação das células bacterianas. Essa classe de drogas foi desenvolvida na década de 1960, no entanto seu uso se intensificou na década de 1980, com o desenvolvimento das fluoroquinolonas, as quais possuem maior atividade antibacteriana (115). Como consequência, os casos e mecanismos moleculares decorrentes da resistência a esses fármacos também aumentaram mais significativamente a partir de 1980. A espécie *K. pneumoniae* possui dentre suas linhagens todos os mecanismos descritos em bactérias gram-negativas para a resistência contra quinolonas, desde mutações nos genes dos alvos farmacológicos, a produção de bombas de efluxo e enzimas de modificação das proteínas-alvo (89) (Figura 34).

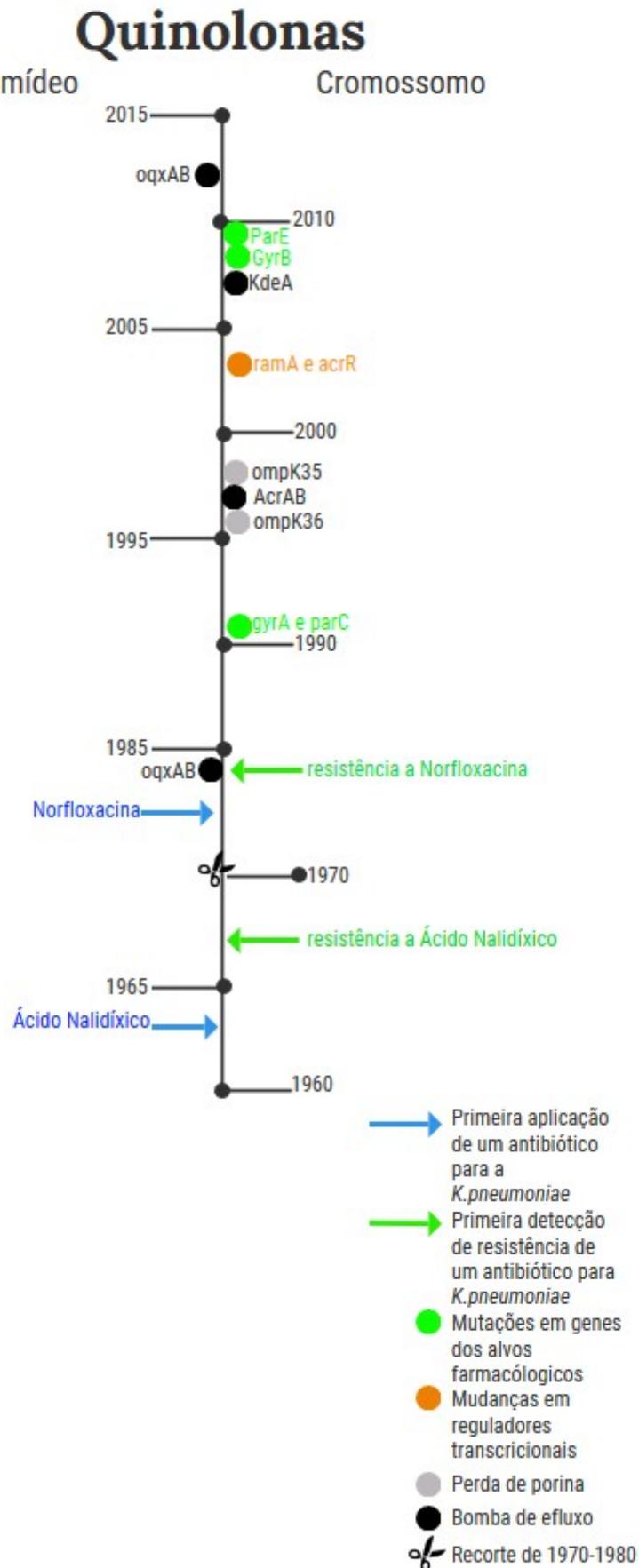


Figura 34. Linha do tempo do uso de quinolonas e aquisição de resistência em *K. pneumoniae*. Adaptado de Navon-Vanezia *et al*, 2017.

Polimixinas são peptídeos cíclicos catiônicos, os quais são capazes de desalojar íons catiônicos associados à membrana periplasmática e de se internalizar junto ao LPS, carregado negativamente. Essas interações levam a formação de poros na membrana, fazendo-a perder sua integridade e impossibilitando o equilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelular da bactéria, a eliminando. Essa classe de antibióticos foi descoberta na década de 1960, no entanto teve seu uso limitado em seres humanos, por sua toxicidade. Seu uso, porém, foi intensificado a partir dos anos 2000, dada a disseminação de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas. Desse modo, a resistência a polimixinas, comumente medicamentos de último recurso, também emergiu a partir desta década. Os mecanismos de resistência a essa classe de antibióticos envolvem enzimas de modificação do LPS, de forma que esse possa perder seu caráter de carga negativa. Essas modificações podem envolver ligantes como a aminoarabinose (gene *pbgP*), fosfoetanolamina (gene *pmrC*) ou palmitato (gene *pagP*). A resistência também pode se dar por meio de alterações em genes de regulação da expressão gênica, relativos a uma menor produção de LPS na célula, como o sistema de dois componentes *phoPQ*. Aumento na produção de cápsula, por meio do grupo de genes *cps*, também pode levar a resistência contra polimixinas, ao servir de barreira entre esses fármacos e o LPS. Como nos demais mecanismos de resistência, também pode haver a contribuição de bombas de efluxo. Destaca-se ainda a emergência do gene *mcr-1*, o qual codifica uma fosfoetanolamina transferase, o qual é detectado em plasmídeos. Esse gene pode ter sido selecionado na espécie *K. pneumoniae* graças ao uso de colistina em granjas de frango, uma vez que o uso desse antibiótico historicamente não foi restrito para aplicações na pecuária (Figura 35) (89).

Polimixinas

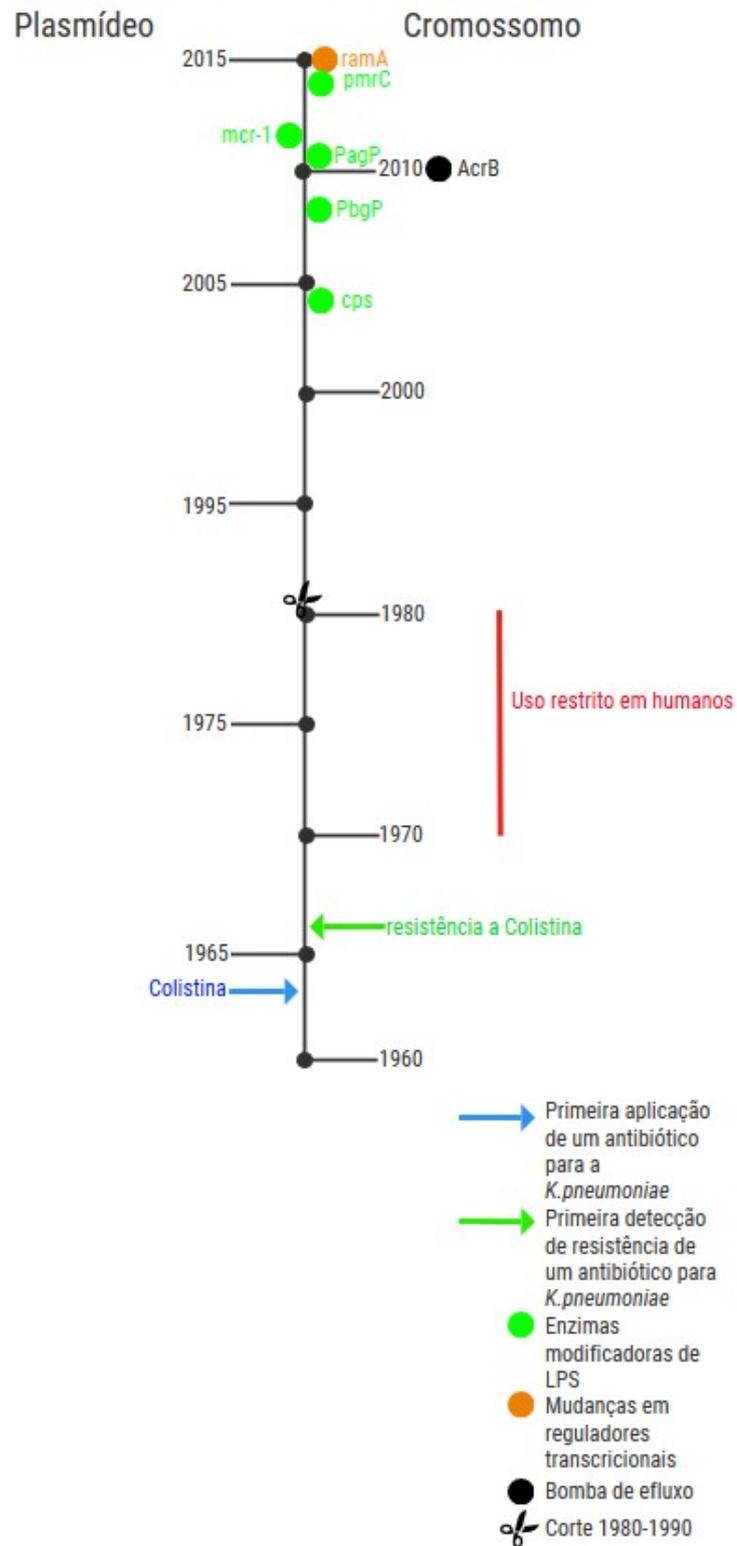


Figura 35. Linha do tempo do uso de polimixinas e aquisição de resistência em *K. pneumoniae*. Adaptado de Navon-Vanezia *et al*, 2017.

O antibiótico tigeciclina é de uma classe relativamente nova de antibióticos, as glicilciclinas, e foi aplicado para o tratamento de infecções de *K. pneumoniae* pela primeira vez em 2005. Porém, cepas da espécie rapidamente desenvolveram formas de resistência a esse antibiótico, envolvendo bombas de efluxo, perda de porinas e modificações nos reguladores de expressão gênica desses (Figura 36) (89).

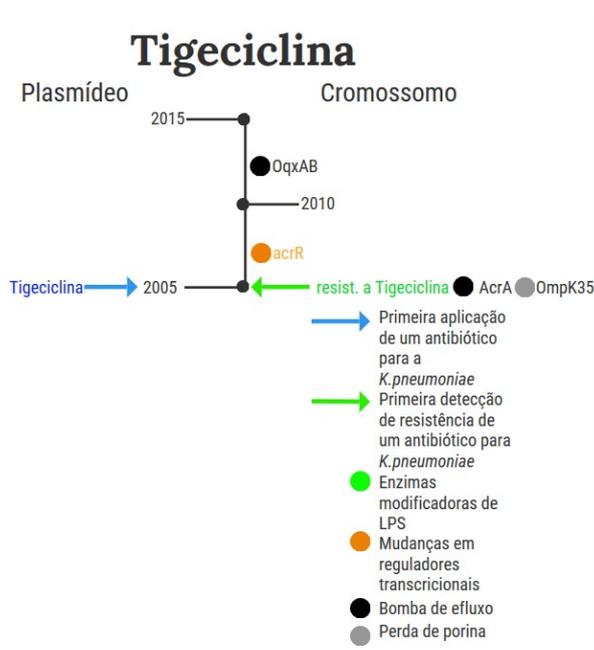


Figura 36. Linha do tempo do uso de tigeciclina e aquisição de resistência em *K. pneumoniae*. Adaptado de Navon-Vanezia *et al*, 2017.

Ao se considerar o panorama epidemiológico de infecções em unidades de tratamento intensivo em adultos no Brasil para 2020, *K.pneumoniae* foi a espécie mais associada a infecções da corrente sanguínea e a segunda espécie mais associada a infecções do trato urinário. Também foi a segunda espécie mais associada a essas infecções na população pediátrica. Em adultos, aproximadamente 70% das infecções causadas por *K.pneumoniae* possuía bactérias resistentes a cefalosporinas, mais de 50% possuía bactérias resistentes a carbapenems e cerca de 15% possuía bactérias resistentes a polimixinas. Já na população pediátrica, cerca de 50% das infecções continham bactérias resistentes a cefalosporinas, 25% a carbapenems e 5% a polimixinas(123). No Distrito Federal, a principal espécie associada a estas formas de infecção em adultos e população pediátrica é *K.pneumoniae*, com a exceção de infecções do trato urinário na pediatria. Em termos de resistência a antimicrobianos, a situação é mais grave no DF, onde a pior situação é a de infecções da corrente sanguínea em adultos: 82% de isolados da espécie eram resistentes a cefalosporinas, 93% destes eram

resistentes a carbapenems e 25% resistentes a polimixinas(124). Dessa forma, o quadro epidemiológico atual mostra a importância de ações contra a disseminação de linhagens bacterianas resistentes a microbianos, particularmente *K.pneumoniae*.

11.3 VIRULÊNCIA

Para a espécie *K. pneumoniae*, quatro fatores de virulência são melhor descritos: lipopolissacarídeos, cápsula, sideróforos e fímbrias. Alguns fatores estão associados a cepas HVkp, embora nenhum seja estritamente necessário para o fenótipo de hipervirulência. Esses fatores são a produção de hipercápsulas, produção de hipermucoviscosidade, cápsulas de sorotipo K1 ou K2 e presença de sideróforos distintos de enterobactina (86, 115). Estes quatro fatores de virulência serão descritos a seguir, bem como as suas particularidades para cepas HVkps, além de discussão breve acerca de fatores de virulência menos caracterizados para a espécie (Figura 37).

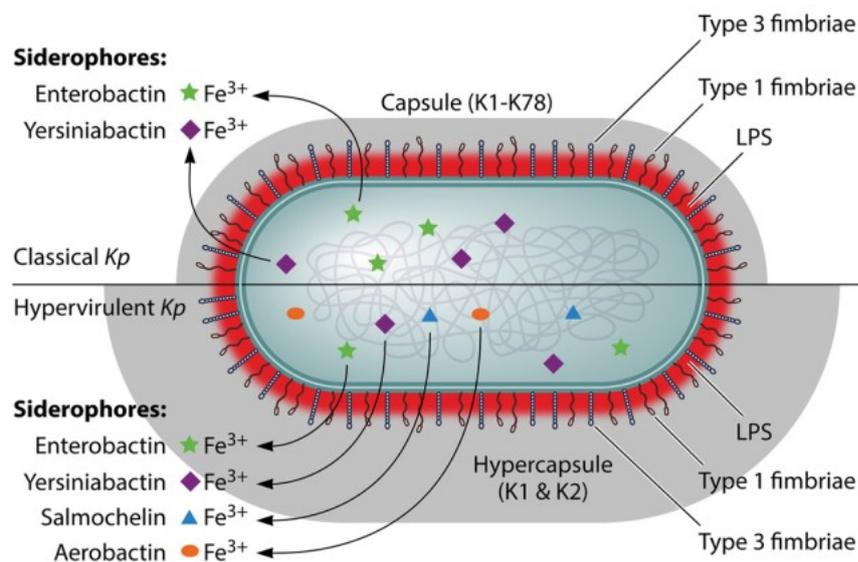


Figura 37. Principais fatores de virulência descritos para CKps e HVkps. CKps possuem tipos capsulares diversos, além de LPS, fímbrias e sideróforo enterobactina. HVkps costumam ter tipos capsulares K1 ou K2, com produção de hipercápsulas, além de repertórios maiores de sideróforos. Retirado de Paczosa e Mecsas, 2016.

O fator de virulência melhor caracterizado até o momento para esta bactéria é a cápsula. Essa atenção se deve, pois, linhagens nocautes para genes de produção capsular são muito menos capazes de infectar modelos murinos, promover metástase infecciosa e letalidade. Em contrapartida, comumente cepas hvkps possuem uma produção exacerbada desta capa polissacarídica, denominada “hipercápsula”. Linhagens com hipercápsula já apresentam maior capacidade de infecção metastática e letalidade do que bactérias sem esse fenótipo (116). Cepas de *K. pneumoniae* podem apresentar diferentes composições de polissacarídeos para a formação de suas cápsulas, sendo reconhecidos até o momento 77 sorotipos capsulares, também conhecidos como antígenos K, e cerca de 138 combinações de alelos gênicos para a produção capsular (86, 116). Dentre os sorotipos capsulares, aqueles pertencentes aos tipos K1 e K2 são os mais prevalentes no grupo das hvkps, embora nem o tipo capsular seja determinante para a hipervirulência nem o contrário seja necessário, com tipos capsulares K3 e K5 também com a possibilidade de apresentar esse fenótipo (117). Os genes necessários para a produção de cápsula se encontram no operon *cps* e essa produção segue passos enzimáticos parecidos dentre os diferentes tipos capsulares. A síntese começa com uma glicosiltransferase ancorada na membrana plasmática da célula, que pode ser WcaJ (cujo substrato é glicose) ou WbaP (cujo substrato é galactose). Essa glicosiltransferase catalisa a ligação de seu carboidrato com um carreador lipídico, o undecaprenil fosfato. Em seguida, diferentes glicosiltransferases podem ligar carboidratos variados, como fucose e ácido urônico, ao glicosil-undecaprenil-fosfato, em sua extremidade não-redutora. O produto destas reações é transportado ao periplasma celular por meio da flipase Wzx, onde esse é utilizado como monômero para a polimerização catalizada pela enzima Wzy, com a remoção dos grupos fosfato. O tamanho da cadeia sacarídica é regulado por Wzc e essa é movida para o exterior celular por meio da exportase Wza. Por fim, a cadeia é ancorada à porção externa da membrana periplasmática por meio da enzima Wzi (118).

Já para o aumento na produção de cápsula, para a formação da hipercápsula, diversos fatores genéticos e ambientais estão envolvidos. Os genes *rmpA* e *rmpA2* (do inglês, *regulator of mucoid phenotype*, *rmp*) podem regular a transcrição de genes do operon *cps* e podem estar presentes no cromossomo ou mobilizados em plasmídeos. Também podem ocorrer mudanças em alelos dos genes *rcaA* e *rcaB*, nativos do operon *cps*, e do gene *magA*, o qual codifica uma polimerase similar a Wzy (117). Já estímulos nutricionais participam da modulação de expressão da cápsula, com a diminuição da cápsula presente em meios ricos e vice-versa, o

que leva a hipótese da cápsula ser capaz de participar na aquisição de nutrientes pela bactéria (117). Uma função melhor estabelecida para a produção de hipercápsula é a de evasão do sistema imune, com diferentes mecanismos ocorrendo para os sorotipos K1 e K2. Cepas com esses tipos capsulares induzem uma menor produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos. Além disso, estas cápsulas possuem em sua composição resíduos de ácido siálico, o qual inibe a sinalização de fagocitose em macrófagos. Também há a ausência de manose, a qual pode ser reconhecida por seu receptor de lectina cognato em macrófagos para a fagocitose. Há ainda uma maior resistência a proteínas do sistema complemento e peptídeos antimicrobianos, os quais frequentemente precisam entrar em contato com membranas plasmáticas para exercer a formação de poros e lise celular. Por fim, esses sorotipos também estão associados a uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias pelo hospedeiro, como TNF- α , IL-6 e aumento na citocina anti-inflamatória IL-10 (117). Embora não tenha sido testada para esta bactéria, uma outra função ainda foi descrita para a cápsula de fungos da espécie *Cryptococcus neoformans*, nos quais uma maior produção de capsula acarreta em uma diminuição na densidade celular desses, o que em tese ajuda na dispersão dos fungos em ambientes líquidos, como sistema linfático (120).

Um fenótipo comumente associado a hipercápsula é o da hiper mucoviscosidade. O primeiro teste desenvolvido para a avaliação desse fenótipo é o teste em fio, no qual bactérias são cultivadas em meio McConkey por 24 horas a 37°C por esgotamento. Após esse período, colônias individuais são suspensas por uma alça de inoculação. Caso se forme um fio com mais de 5 mm de altura, o teste é considerado positivo (89). No entanto, esse teste pode sofrer alterações em sua leitura, como quantidade de inóculo, assim outros testes vêm sendo desenvolvidos para a detecção da hiper mucoviscosidade, como a centrifugação em gradiente descontínuo de percoll (119). De todo modo, esse fenótipo também está associado a infecções invasivas para a espécie e os genes *rmpA* e *rmpA2* estão relacionados a este (88).

Outro fator de virulência mais associado à superfície bacteriana é o lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana periplasmática de bactérias gram-negativas. O LPS é constituído por um oligosacarídeo, também conhecido como antígeno O, e um lipídeo A. Estes são sintetizados pelos grupos de genes *wb* e *waa* para a porção de carboidrato e o grupo de genes *lpx* para a porção lipídica. Existem atualmente 9 sorotipos distintos de antígeno O, com 12 *loci* gênicos diferentes. Os sorotipos O1 e O2 são os mais comuns em isolados clínicos e esses podem estar envolvidos na evasão de fagocitose. Além disso, a presença de LPS nas bactérias as torna menos suscetíveis a ação bactericida de componentes do sistema complemento, contudo também é um PAMP (padrão molecular de associação a patógeno, do

inglês, *pathogen-associated molecular pattern*) proeminente da bactéria, sendo reconhecida por diferentes receptores, em particular o TLR4, para a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células da resposta imune inata (86, 115).

Ainda na superfície bacteriana, destacam-se as fímbrias tipo 1 e 3, as quais são importantes para a adesão da bactéria em diferentes substratos. As fímbrias tipo 1 são lineares e são sintetizadas pelo grupo gênico *fimACFGHK*, para as quais a proteína FimA é o maior componente estrutural e a proteína FimH determina as propriedades adesivas da estrutura, estando ao final dessa. Esse tipo de fímbria é capaz de se ligar em glicoproteínas D-manosiladas, sendo, portanto, classificadas também como sensíveis a manose. Já fímbrias tipo 3 são helicoidais e são sintetizadas pelo grupo gênico *mrkABCD*. A hélice é estruturada por sub-unidades de MrkA e MrkD se situa no final da estrutura. Essas fímbrias se ligam em colágenos extracelulares, mas não foi determinado qual o sítio de ligação, embora sabe-se que não é manose, sendo fímbrias insensíveis a esse carboidrato (117).

Já em termos nutricionais, um nutriente importante para o crescimento de diversos organismos é o ferro. Em mamíferos, ferro geralmente está associado a moléculas de transporte, como a transferrina. Esses organismos também podem utilizar de moléculas distintas como lactoferrina para uma ligação mais forte com o ferro, como forma de resposta imune a patógenos. Assim, a principal estratégia para vários patógenos, como *K. pneumoniae*, para a aquisição de ferro a partir do hospedeiro é a secreção e reabsorção de moléculas que possuam afinidade a ferro maior do que moléculas do hospedeiro. Sideróforos são um tipo de pequenas moléculas orgânicas capazes de fazê-lo, tanto para a obtenção de ferro em um hospedeiro quanto a partir de ambientes externos a esse. Praticamente todas as linhagens de *K. pneumoniae* possuem o locus gênico completo para a biossíntese do sideróforo enterobactina em seu cromossomo (*entABCDEF* para síntese e *fepABCDG* para transporte). No entanto, hospedeiros mamíferos são capazes de secretar a proteína lipocalina-2 a partir de neutrófilos e células epiteliais. Essa proteína é capaz de se ligar e neutralizar enterobactinas, o que impede o crescimento da bactéria. Além disso, a proteína auxilia no recrutamento de neutrófilos para um dado sítio de infecção. Cepas HVhps costumam apresentar de um a três sistemas a mais de sideróforos, quanto maior este repertório, maiores as chances de uma dada cepa ser hipervirulenta. O sideróforo salmoquelina é uma forma glicosilada de enterobactina e essa modificação é feita pelos genes *iroBCDE*, os quais podem estar no cromossomo ou em plasmídeos. Essa glicosilação impede a ligação de lipocalina-2 ao sideróforo, impedindo sua inativação e recrutamento de neutrófilos. Já o sideróforo aerobactina é estruturalmente distinto dos anteriores, com afinidade menor a ferro do que estes, mas sem reconhecimento

por lipocalina-2. Esse sideróforo é sintetizado pelos genes *iucABCD* e seu transporte ocorre por meio do gene *iutA* (86, 115). Por fim, o sideróforo yersiniabactina também é estruturalmente distinto de enterobactina e salmoquelina e possui menor afinidade por ferro. Esse sideróforo é sintetizado pelos genes *irp1*, *irp2* e *ybtESTU* e mobilizado pelos genes *ybtPQ* e *fyuA* (122).

Outros fafores de virulência vem sendo estudados mais recentemente em relação a *K. pneumoniae*, aqui com uma breve descrição. A bomba de efluxo ArcAB já mencionada na sessão de resistência a antimicrobianos, também contribui para resistência contra peptídeos antimicrobianos do hospedeiro (117). O policetídeo colibactina é uma pequena molécula orgânica com ação mutagênica em células eucarióticas. A capacidade de síntese dessa molécula está associada a clones de *K. pneumoniae* causadores de abscessos de fígado (88). A allantoina é um intermediário na via de degradação de purinas, a qual pode ser utilizada como fonte de carbono e nitrogênio por algumas cepas de *K. pneumoniae*. Algumas cepas capazes de causar abscessos piogênicos no fígado possuem um operon para a degradação dessa molécula (115, 121). O operon *ter* em bactérias confere resistência ao óxido de telurito. Em *K. pneumoniae*, esse operon é encontrado em plasmídeos e confere resistência a essa bactéria contra ácidos graxos de cadeia curta produzida por algumas bactérias da microbiota intestinal, sendo assim um fator de virulência ao auxiliar na colonização (124). Por fim, o sistema de secreção tipo 6 (T6SS) é codificado por um a três loci gênicos, correspondendo ao menos 13 proteínas (125). Com o T6SS, cepas de *K. pneumoniae* respondem a fatores de estresse para a bactéria, tais como presença de antimicrobianos, baixa concentração de ferro, alta concentração de sódio ou ainda a presença de outras linhagens bacterianas com esse sistema de secreção. Com esse aparato, a bactéria é capaz de secretar toxinas em células eucarióticas ou procarióticas, tais como DNAses ou proteínas que desencadeiam estresse oxidativo, sendo assim importante para competição com outras bactérias e colonização do hospedeiro (123, 124).

11.4 TRANSPOSONS

Bactérias têm como principal forma de reprodução a fissão binária ou cissiparidade, um evento assexuado. No entanto, o domínio bactéria possui uma diversidade considerável de

espécies e de genes (127), bem como é notória a emergência de fenótipos novos em bactérias em períodos relativamente pequenos, tais quais o surgimento de multirresistência a antimicrobianos e de hipervirulência em *K. pneumoniae*, já citados. Dessa forma, a diversidade gênica deste domínio se dá por dois processos principais, as mutações e a transmissão horizontal de genes (do inglês, *horizontal gene transfer*, HGT).

A mutação aleatória em bases nitrogenadas do DNA, acoplada a tempos de geração usualmente curtos, permite a seleção de bactérias com fenótipos mais aptos a um ambiente em escalas temporais relativamente curtas. Por exemplo, após um período de 30 anos de cultivos em repique laboratorial, o que proporcionou 31.500 gerações, linhagens de *E. coli* se tornaram capazes de usar uma nova fonte de carbono para a espécie, o citrato (128). Apesar de estocásticos, os eventos de mutação podem ter sua taxa acelerada por algumas bactérias, o que se cunha na literatura científica como evolvabilidade (129). Mecanismos controlados de resposta a danos no DNA, como a resposta SOS, podem promover a atividade de DNA polimerases de alta susceptibilidade a erro, assim introduzindo mutações no DNA bacteriano em taxas maiores que eventos aleatórios de mutação (129).

Em adição aos eventos de mutação, está a transferência horizontal de genes. Uma vez que a reprodução de bactérias se dá majoritariamente de forma assexuada, a geração de progênie ocorre na forma de clones em relação à geração anterior. Assim sendo, a transmissão de variabilidade genética não ocorre verticalmente entre gerações, salvo mutações, mas pode ocorrer entre bactérias que compartilhem o mesmo espaço, em vez de compartilhar uma ancestralidade temporal. Tal é a ocorrência de HGT em bactérias que a representação gráfica de “árvore” filogenética poderia ser melhor representada como uma “rede” (128, 129). Há ainda quem defenda uma visão centrada em genes em vez de espécies bacterianas para definir microbiomas, onde esses seriam uma coleção de genes adaptados a um dado ambiente em vez de comunidades de espécies localmente adaptadas (128, 130). Dentro da HGT, três mecanismos principais atuam: transformação, transdução e conjugação. Em síntese, na transformação, DNA exógeno à bactéria é incorporado a essa; na transdução, vírions introduzem seu genoma em genomas bacterianos, processo esse que pode também ser cooptado por ilhas de patogenicidade bacteriana para seu empacotamento em capsídeos vírais e na conjugação, plasmídeos podem ser transmitidos entre bactérias por meio de pili conjugativos. Esses também podem transmitir elementos conjugativos e integrativos (do inglês *integrative and conjugative elements*, ICEs), os quais diferem de plasmídeos ao não possuírem uma origem de replicação própria e precisarem se integrar a um elemento de DNA capaz de replicação autônoma (129, 131).

Além dos ICEs, outros elementos integrativos são componentes importantes dentro de mutações e HGTs, as chamadas sequências de inserção (IS) e Transposons (Tns), também conhecidos como sequências transponíveis, uma vez que esses são responsáveis pela locomoção de genes e outros elementos do material genético entre diferentes moléculas, como entre cromossomo e plasmídeos. (figura 38).

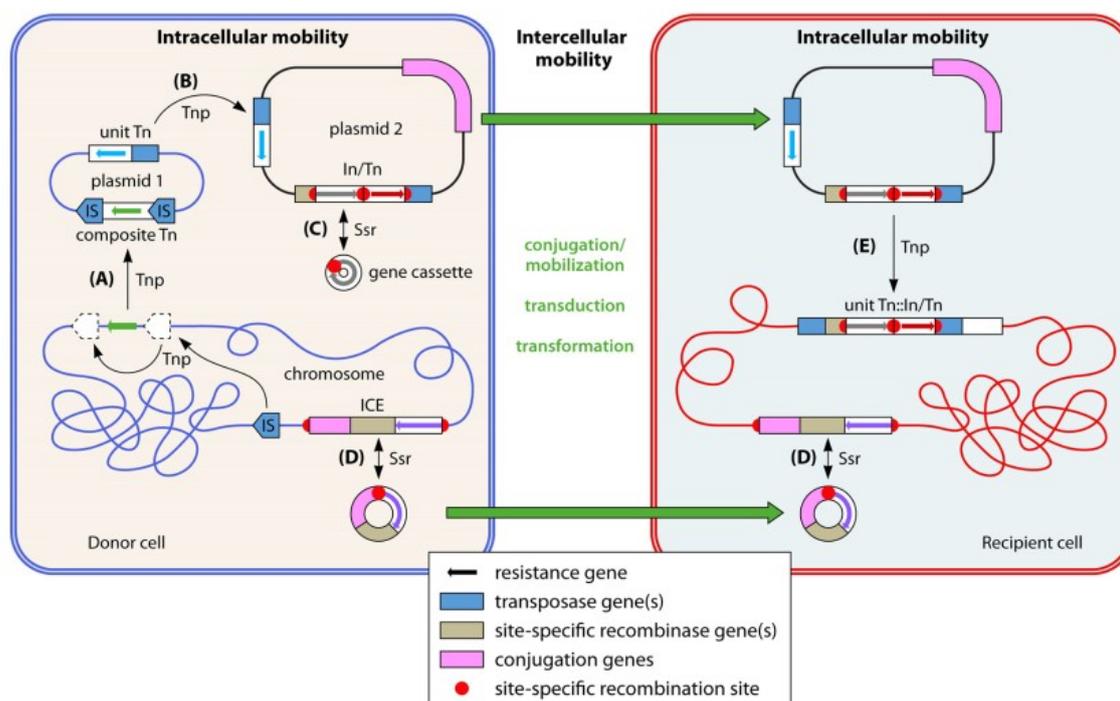


Figura 38. Principais formas de transmissão horizontal de genes e elementos gênicos envolvidos. Eventos de transformação adquirem DNA exógeno à bactéria, enquanto conjugação mobiliza plasmídeos e ICEs entre bactérias e transdução mobiliza material genético entre bactérias por meio de bacteriófagos. A mobilidade de material genético entre diferentes moléculas se dá por sequências de inserção, transposons e atividades de recombinação com ou sem esses elementos móveis. Retirado de Partridge *et al*, 2018.

As sequências transponíveis foram identificadas pela primeira vez por Barbara McClintock, a qual recebeu o prêmio nobel de medicina ou fisiologia de 1983 por isso. Também é atribuída a McClintock a afirmação pela primeira vez de que sequências transponíveis são elementos importantes para a evolução dos organismos (142). Em bactérias, os elementos transponíveis foram descobertos pela primeira vez por outra cientista, Naomi Datta, a qual também propôs que esses elementos eram importantes na transmissão de genes de resistência a antimicrobianos entre linhagens de *Salmonella Typhimurium* (143). Em termos de classificação, sequências de inserção costumam ser curtas (0,7 a 3 kb) e incluem

apenas elementos necessários para seus eventos de transposição em genomas, quais sejam um gene de recombinase flanqueado por sequências repetitivas curtas e invertidas, reconhecidas pela recombinase como loco de recombinação. Já transposons costumam ser maiores e apresentar elementos os quais não participam de seus eventos de transposição, ditos elementos passageiros. Transposons ainda podem ser classificados entre simples e compostos, ao necessitarem de um ou mais genes de transposase, respectivamente. Estes elementos passageiros podem conferir diversos fenótipos adaptativos ao microrganismo hospedeiro, como resistência a moléculas antimicrobianas, virulência, dentre outros. Já a mobilização destes passageiros pode se dar não apenas entre moléculas de DNA pelos transposons, mas também entre organismos diferentes, pelos mecanismos de transferência horizontal de genes (133). Essa mobilização pode trazer consequências graves dentro de contextos de microbiologia médica, uma vez que já existe registro de genes de resistência a antimicrobianos disseminados entre moléculas de DNA e hospedeiros dentro de hospitais, causando surtos de infecções resistentes a antimicrobianos (132). Já em termos de mutação, a expansão de cópias de sequências de inserção em genomas pode conferir benefícios de aptidão em um momento inicial, no entanto ao longo do tempo, podem apresentar efeitos deletérios, uma vez que organismos precisam se equilibrar entre diversidade alélica e estabilidade funcional do genoma para manter sua aptidão (135).

Como indica o trabalho de Consuegra e colaboradores (133), a replicação de sequências capazes de integração em um genoma pode influenciar de forma positiva ou negativa a aptidão da célula portadora desse genoma. Dentro das ciências biológicas, comportamento social pode ser entendido como a interação entre um número plural de entidades biológicas, de forma a alterar a aptidão dos indivíduos envolvidos. As interações sociais em um grupo tendem a favorecer a seleção do grupo, em detrimento da aptidão de indivíduos. No entanto, estratégias de benefício individual de uma entidade podem ser benéficas a ela em termos de aptidão, em detrimento do grupo, estratégias ditas “egoístas”. A partir desse cenário, genes e outros elementos do genoma, não só podem ser alvos de seleção natural, como também podem adotar estratégias ditas egoístas para a sua manutenção (136). Segundo a hipótese do gene egoísta, a seleção natural pode ser descrita como uma competição entre genes, uma vez que esses e não os organismos, que podem passar por manutenção ou mudança ao longo de longas escalas de tempo (137). Quando uma entidade se torna mais apta a um dado ambiente, esse pode conter tanto elementos abióticos (índices de precipitação, quantidade de sais minerais no solo, etc) como elementos bióticos. E na situação de aumento de aptidão em termos de relações com outros componentes bióticos, esse aumento de aptidão

serve, por sua vez, como pressão seletiva para esses demais componentes bióticos, o que pode ser conceituado como co-evolução. Por exemplo, uma espécie predadora que se torna mais capaz de capturar presas oferece uma pressão seletiva maior a essas presas para se adaptarem em resposta. Em situações de antagonismo, como a do exemplo dado, a aptidão de ambos os componentes da interação não pode se tornar ótima um em relação ao outro simultaneamente (predadores que sempre capturam suas presas e presas que sempre escapam de seus predadores). Portanto, nestas situações de antagonismo, a recorrência de interações leva a uma interação na qual quando uma entidade se torna mais apta, a correspondente se torna, por sua vez, menos apta. Essa recorrência ocorre até que a co-evolução deixe de existir, seja pela extinção de um dos componentes, seja pelo escape de um desses componentes da interação (ex: predadores que deixam de consumir a presa em favor de outras fontes alimentares) (134). Van Valen (1973) (136) deu a esta concepção o nome de Hipótese da rainha vermelha, em alusão à obra “Alice no País das Maravilhas” de Lewis Carroll, onde em dado momento, Alice corre contra a rainha vermelha em um tabuleiro e não para sair do lugar, apenas para manter a corrida e não ser deixada para trás pela concorrente.

Interações antagonistas, ou envolvendo egoístas, como predador-presa e hospedeiro-patógeno também podem ocorrer em nível molecular, os chamados conflitos genéticos. Plasmídeos podem conter genes anti enzimas de restrição ou ainda conter pares de genes de toxina-antitoxina, para aumentar suas chances de preservação dentro de um genoma (136). Já para sequências de inserção e transposons, as interações iniciais com o hospedeiro podem ser benéficas, ao aumentar a diversidade gênica, mas o acúmulo dessas sequências pode comprometer a estabilidade funcional do genoma, como já apontado em Consuegra e colaboradores (133). Como McLaughlin e Malik discutem (134), esses elementos transponíveis precisam se replicar numa taxa superior a do genoma hospedeiro, a fim de se evitar a inativação desses por mutações. Da mesma forma, poucos eventos de transposição podem resultar em baixa aptidão para os transposons, mas uma aptidão maior ao genoma hospedeiro e vice-versa. Assim se estabelece o conflito entre elementos transponíveis e genomas células hospedeiras, o que pode levar a diversificação de formas dos elementos móveis.

É possível aliar esta concepção de transposons egoístas com a proposta de Gillings e colaboradores (137) para o entendimento de evolução destes. Os autores propõem que elementos gênicos móveis externos a um dado ambiente, elementos xenogênicos, também sejam entendidos como poluentes, como se faz usualmente com coliformes fecais em ambientes aquáticos, por exemplo. Segundo esses autores, poluentes podem ser classificados

como “convencionais”, finitos e pré-existentes como petróleo; “xenobióticos”, finitos e de origem antrópica, como inseticidas, herbicidas, fármacos sintéticos, protetores solares, dentre outros; “espécies invasoras”, capazes de se replicar e pré-existentes, como espécies exóticas de plantas e animais e “xenogeneicos”, capazes de se replicar e de origem antrópica, uma vez que poluentes xenobióticos, promovem a seleção de arranjos novos de genes de aptidão frente a estes poluentes, em associação com elementos genéticos móveis. Um exemplo prevalente de elemento xenogeneico são plasmídeos ou transposons que possuem genes de resistência a antibióticos. Uma vez que a maior parte das classes de antibióticos foi descoberta a partir de bactérias do solo, essas e outros participantes de microbiotas nativas, possuíam genes de resistência a antibióticos antes do ser humano passar a usar massivamente dessas moléculas. Assim, além das mutações *de novo* em bactérias de interesse médico, o que as torna cada vez mais resistentes ao uso de antimicrobianos é a mobilização de genes de resistência entre si por meio de elementos gênicos móveis.

Portanto, a evolução de sequências de inserção e transposons é complexa e seu grau de complexidade pode ser maior nesses últimos, ao carrearem genes passageiros que aumentem aptidão de células hospedeiras, particularmente em ambientes antrópicos em rápida mudança. Contudo, dada a importância que os fenótipos desses genes passageiros podem oferecer nas sociedades humanas, como a disseminação de resistência a antimicrobianos, torna-se necessário o melhor entendimento de quais são estas sequências em um dado ambiente e como elas podem vir a interagir com este. Larsson e Flach (94) propõem que o espalhamento de genes de resistência a antimicrobianos em bactérias patogênicas a humanos se dá em quatro etapas. Primeiro, um gene de resistência precisa adquirir mobilidade dentro de um genoma, por meio de IS ou Tns. Segundo, esse elemento móvel precisa se mover para um elemento capaz de mobilidade entre genomas, como plasmídeos ou ICEs. Terceiro, é preciso ocorrer a própria transmissão do plasmídeo ou ICE entre genomas bacterianos. Por fim, um passo que pode ocorrer a qualquer instante entre os três primeiros é mobilização do gene de resistência de uma bactéria ambiental a um microbioma de animais de criação ou o próprio microbioma humano. A pressão seletiva para a manutenção de genes de resistência ocorre de forma mais intensa apenas em microbiotas humanas e animais, onde há maiores concentrações de antibióticos. Ainda segundo esses autores, transmissão de bactérias entre animais e humanos seria mais comum e mais prevenível forma de mobilização de genes de resistência, embora a aquisição de genes a partir de isolados ambientais também é possível. Já para a espécie *K. pneumoniae*, destaca-se que o *locus* gênico para a biossíntese de yersinabactina e para colibactina está frequentemente associado a um ICE, chamado ICEkp

(122), bem como a transmissão de diversos genes de carbapenemase está ligada a sequências transponíveis (90).

11.5 VIGILÂNCIA GENÔMICA

Desde o trabalho de John Snow, o qual é apontado como a origem do ramo da epidemiologia e que um poço contaminado era a fonte responsável por um surto de Cólera em Londres (140), diversas tecnologias foram sendo desenvolvidas para o estudo de microrganismos, desde métodos de microscopia, cultivo, análises bioquímicas e testes genômicos. Esses últimos têm ganhado cada vez mais importância atualmente.

O advento da pandemia de COVID-19 demanda de governos ao redor do planeta uma série de respostas sanitárias. Dentre essas respostas, está a dita vigilância genômica. Essa medida utiliza de técnicas de genômica para auxiliar na identificação de pessoas infectadas com o vírus Sars-CoV2 e ajudar na orientação de isolamento dessas pessoas e rastreamento de potenciais casos. Além disso, essa técnica também tem sido utilizada para a identificação e estimativa de prevalência em uma dada população humana de variantes virais (141). É possível ainda se monitorar a circulação do vírus, ou de outros agentes infecciosos, com base na presença de seu material genético nas redes de esgoto, o que se cunha como epidemiologia baseada em água (do inglês, *water-based epidemiology*) (149).

Apesar da notoriedade dessa resposta frente a esta pandemia e sua contenção, a vigilância genômica possui aplicações relevantes em diferentes contextos. Sob a ótica da microbiologia médica, testes fenotípicos e moleculares apresentam limitações, algumas das quais podem ser importantes tanto para a condução de prognósticos favoráveis aos pacientes quanto para a identificação de genótipos relevantes e sua transmissão em um dado ambiente. Primeiro, testes rápidos moleculares estão comercialmente disponíveis para um número pequeno de patógenos e genes (142). Métodos dependentes de cultivo têm limitações associadas ao crescimento dos microrganismos, tais como o número de espécies cultiváveis em laboratório, tempos de crescimento longos para microrganismos fastidiosos, viés de cultura para espécies microbianas de crescimento mais rápido e riscos de contaminação. Assim sendo, tecnologias de sequenciamento de nova geração podem ser incorporadas a rotina laboratorial de forma a permitir a identificação de genótipos e espécies de interesse de

forma mais rápida, não-direcionada a um dado gene e sem vieses de crescimento, esse último no caso particular de metagenomas (140).

Embora o projeto genoma humano tenha sua primeira versão concluída com sucesso utilizando sequenciamento de DNA de primeira geração, Sanger, esse processo demorou mais de 10 anos e custou bilhões de dólares (143). Genomas de microrganismos, menores que o do ser humano, já podiam ser analisados com essa tecnologia, por exemplo o genoma da bactéria de importância agrícola *Xylella fastidiosa*, maior projeto científico à época do Brasil (144). No entanto, o sequenciamento de genomas se tornou uma ferramenta mais acessível com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (do inglês, *next generation sequencing*, NGS) (143). As ferramentas de NGS podem ser classificadas entre dois grupos, as tecnologias de segunda geração, de leituras curtas do DNA (do inglês, *short reads*) e as tecnologias de terceira geração, de leituras longas do DNA (do inglês, *long reads*).

A plataforma mais utilizada atualmente para sequenciamento de segunda geração é da fabricante Illumina. Em síntese, após a extração de DNA de uma amostra, esse é fragmentado em sequências pequenas por sonicação ou enzimas de restrição, essas últimas com o risco de vieses de sequenciamento para organismos com conteúdo AT ou GC muito distantes de 50%. Em seguida, são adicionadas sequências adaptadoras, as quais são utilizadas para fixar as sequências resultantes sobre o aparato de sequenciamento (*flow cell*), adicionar sequências complementares a primers e adicionar sequências para identificação individual de cada uma. Ao se fixar cada sequência com um identificador único, é possível determinar a sequência de vários fragmentos de DNA simultaneamente, o que diminui fortemente o custo da ferramenta. Após a preparação dessas sequências, isso é a preparação da biblioteca de sequenciamento, cada sequência (75 a 300 pb) é submetida a rodadas intercaladas de incorporação de nucleotídeo, leitura de fluorescência desse nucleotídeo marcado e remoção do fluoróforo para o prosseguimento da reação de polimerização. Assim, são geradas as leituras curtas, as quais são discriminadas por meio de seu identificador único. Após a geração dessas leituras, as sequências introduzidas para a reação do sequenciamento podem ser removidas em computadores, em um processo chamado de corte (do inglês, *trimming*). Por esse processo, também podem ser removidas as sequências cujo chamamento de base (do inglês, *base calling*) forem dúbias, sendo assim de baixa qualidade. As leituras remanescentes podem ser usadas para a montagem do genoma, principalmente por meio do grafo de de Bruijn para a montagem do zero de um genoma. A montagem também pode acontecer ao se mapear as leituras geradas em sobreposição a um segundo genoma anteriormente montado, no entanto esse processo tende a enviesar a montagem para a não-detecção de variantes estruturais do

genoma a ser montado. De todo modo, ao final desse processo, são geradas sequências contíguas (do inglês, *contiguous sequences*, *contigs*). Após a montagem, diferentes programas computacionais podem ser usados para o reconhecimento de sequências e motivos, de forma a permitir a atribuição de qualidades (genes, promotores, dentre outros) às sequências contíguas geradas pela montagem, processo esse denominado anotação do genoma. O sequenciamento de leituras curtas permite um chamamento de base de acurácia muito alta, no entanto os *contigs* resultantes costumam ser numerosos, o que dificulta a identificação de elementos gênicos extensos, como transposons e plasmídeos (140, 143).

Já para o sequenciamento de leituras longas, de terceira geração, as plataformas mais utilizadas atualmente são da Pacific Biosciences (Pacbio) ou Oxford Nanopore. Uma vez que essa geração utiliza de leituras longas de DNA (>500 pb), a extração de DNA de um organismo deve ser feita da forma a se preservar ao máximo o tamanho das sequências. Em seguida, o DNA obtido deve ser de-circularizado (140). Para as tecnologias da Pacbio, o DNA resultante é ligado a sequências adaptadoras, tornando-os circulares, e introduzido-os em canais contendo DNA polimerases fixadas ao substrato do aparato de sequenciamento. Em seguida, se dá a alternância entre introdução de nucleotídeo, excitação e leitura de fluorescência desse e remoção do fluoróforo (145). Já em tecnologias Nanopore, o DNA entra em contato com canais proteicos fixados a uma membrana sintética. Esses canais possuem helicases fusionados a eles, de forma a permitir a abertura do DNA fita dupla e a introdução de DNA fita simples pelo canal. Por dentro dos canais, também há a passagem de íons, gerando corrente elétrica. Conforme cada base passa pelo canal proteico, a quantidade de íons, e, portanto, a corrente, muda. As mudanças na corrente podem ser detectadas e interpretadas pelo sequenciador, de forma a corresponder cada mudança a uma base distinta (145). Após o processo de corte, a anotação dessas leituras pode ocorrer, com um método comum sendo a sobreposição de sequências idênticas entre diferentes leituras para a formação de contigs. As tecnologias de leituras longas permitem a geração de leituras em tempos mais curtos que a plataforma illumina e, ao serem longas, facilitam a anotação de elementos gênicos longos. No entanto, o chamamento de base dessas tecnologias, particularmente da Nanopore, é inferior a de tecnologias de leituras curtas. Dessa forma, é possível superar as limitações de ambas as gerações de tecnologia de sequenciamento ao combiná-las. Um genoma pode ser montado do zero a partir de leituras longas e leituras curtas podem ser mapeadas contra essa montagem, de forma a aumentar a qualidade do chamamento de bases. Essa estratégia é denominada montagem híbrida e corresponde ao padrão ouro para análise de genomas (142).

12 JUSTIFICATIVA

Embora não tenha sido o intuito original do presente trabalho realizar uma análise epidemiológica da dispersão de *K. pneumoniae* no Distrito Federal, a análise de características genéticas do isolado KpV3 poderia trazer informações importantes quanto a sua relevância clínica, bem como orientar pesquisas futuras quanto a epidemiologia dessa espécie e fatores de resistência a antimicrobianos e virulência no DF.

13 OBJETIVO

13.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar a presença de características de relevância médica, tais como hipervirulência e resistência a antimicrobianos, com ênfase em análises genômicas, na linhagem KpV3.

13.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o antibiograma da linhagem KpV3;
- Identificar no genoma da linhagem KpV3 características genômicas, tais como presença, variantes e número de genes e elementos gênicos móveis, potencialmente relacionados aos fenótipos de (hiper)virulência e resistência a antimicrobianos;
- Comparar as características genômicas encontradas na linhagem KpV3 com genomas de *Klebsiella pneumoniae* depositadas no NCBI, bem como genomas da espécie de isolados no DF.

14 MATERIAL E MÉTODOS

14.1 CRESCIMENTO EM MEIO ÁGAR MCCONKEY

A partir de uma cultura de pré-inóculo crescida overnight a 25°C, uma placa de meio ágar McConkey (Kasvi) foi inoculada por estria em esgotamento 24 h e 25°C.

14.2 CONTRASTAÇÃO NEGATIVA POR TINTA NANQUIM

A partir de uma cultura de pré-inóculo crescida overnight a 25°C, 10 µL da cultura resultante foram retirados e pipetados sobre lâmina de microscópio. Uma gota de tinta nanquim (Acrilex) foi adicionada sobre a cultura na lâmina. Após isso, uma lamínula foi acrescentada e a lâmina foi observada em microscopia de luz simples no microscópio (Primostar, Zeiss) em aumento de 1000x.

14.3 SÉRIE BIOQUÍMICA

A série bioquímica foi feita em meio Rugai com Lisina (Laborclin), a qual foi inoculada conforme instruções do fabricante a partir de cultura de LB do isolado. Após inoculado, o meio foi incubado a 25°C por 24 h e então a leitura dos resultados foi feita conforme o fabricante.

14.4 ANTIBIOGRAMA

Uma cultura de 5 mL em LB da cepa KpV3 teve a sua densidade óptica ajustada a um padrão de McFarland de 0,5 (204,0 μM BaCl_2 ; 17,9 mM H_2SO_4), por meio de absorbância a 625 nm no espectrofotômetro Spectramax V5. A partir dessa cultura ajustada, 100 μL dessa foram inoculados por *spread plate* em placas de petri de 60 mm contendo 25 mL de meio ágar Müller-Hinton (Kasvi). Em seguida, 14 discos contendo antibióticos (Amicacina (30 μg), Gentamicina (10 μg), Tobramicina (10 μg), Aztreonam (30 μg), Cefepime (30 μg), Ofloxacina (5 μg), Norfloxacina (10 μg), Ciprofloxacina (5 μg), Levofloxacina (5 μg), Lomefloxacina (10 μg), Inipenem (10 μg), Meropenem (10 μg), Piperaciclina/tazobactam (110 μg) e Ticarciclina/ácido clavulânico (85 μg) Sensidisc, DME) foram pressionados contra as placas, de forma que os discos estivessem a 30 mm de distância um do outro. Após incubação a 37°C por 24 h, o diâmetro dos halos de inibição foi medido por régua e a classificação da cepa em sensível ou resistente se deu conforme instruções da fabricante dos discos e em conformidade com a classificação do grupo EUCAST (<https://eucast.org>). Em seguida, o isolado bacteriano foi classificado conforme proposto por Magiorakos e colegas (160). Segundo os autores, isolados bacterianos podem ser classificados quanto ao seu perfil de resistência em três grupos, além do grupo de bactérias suscetíveis a essa quimioterapia. Bactérias resistentes a pelo menos um agente em três categorias antimicrobianas, separadas por suas classes de antibiótico, são consideradas pelos autores como multiresistentes a antimicrobianos (do inglês, *multidrug resistant*, MDR). Já aquelas resistentes a todas as opções quimioterápicas disponíveis para a espécie, com a exceção de no máximo duas classes de antibiótico, são as extensivas ou extremamente resistentes a antimicrobianos (do inglês, *extensively drug resistant*, XDR). Por fim, bactérias resistentes a todas as opções quimioterápicas disponíveis para a espécie são as bactérias panresistentes (do inglês, *pan drug resistant*, PDR).

14.5 ANÁLISES GENÔMICAS DO ISOLADO KPV3 DE INTERESSE MÉDICO

No pipeline bacannot (<https://github.com/fmalmeida/bacannot>), os *loci* para biossíntese de cápsula (K) e LPS (O) foram identificados com o programa Kaptive. A análise *in silico* de MLST foi feita com base no esquema de MLST disponível para a espécie (<https://bigsdB.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). O banco de dados Virulence Factor Database (VFDB) (144) foi consultado para a identificação de genes associados a virulência. Genes de resistência a antimicrobianos foram identificados usando os programas CARD-RGI (versão 3.0.7) (145), AMRFinderPlus (versão 3.2.1) (146) e Resfinder (versão 4.0) (147). Sequências de profagos foram identificadas por meio do programa Phigaro (148). Replicons plasmidiais foram detectados com os programas Plasmid Finder (versão 2.1) (149) e Platon (versão 1.5.0) (150). A anotação resultante foi inspecionada manualmente no navegador de genomas Artemis (151) e a predição de domínios para os genes *vgrg4*-like foi feita com Cdvist (152).

14.6 GENÔMICA COMPARATIVA

A identificação do isolado baseada em genômica foi feita pelo servidor Type Strain Genome Server (TYGS) (153). O programa FastANI (44) foi utilizado para o cálculo de Average nucleotide identity contra os genomas de *K. pneumoniae* depositados no NCBI (acesso em abril 2021). Para os genomas com valores de ANI superiores a 99, além da cepa KpBSB31 (154), a filogenia de genes core foi construída com o programa Parsnp (155), cuja árvore filogenética foi visualizada com o programa ggtree (156). O programa Grapetree (157), contido no banco de dados BIGSdb (<https://bigsdB.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>), foi utilizado para visualizar as relações filogenéticas entre os STs de *K. pneumoniae*, com o parâmetro de Minimum Spanning Tree.

15 RESULTADOS E DISCUSSÃO

15.1 CARACTERIZAÇÕES FENOTÍPICAS

Ensaio de coloração de gram e cultivo em meio MacConkey indicam que o isolado trata-se de uma bactéria gram negativa. No ensaio de gram, as células apresentaram morfologia variante entre cocos e bacilos. Já na placa de meio MacConkey, as colônias apresentaram coloração rosa, sendo assim fermentadoras de lactose, e aspecto mucoide. O aspecto mucoide poderia ser pela presença de cápsula pelas bactérias, o que foi confirmado por contrastação negativa das bactérias por tinta nanquim (Figura 39).

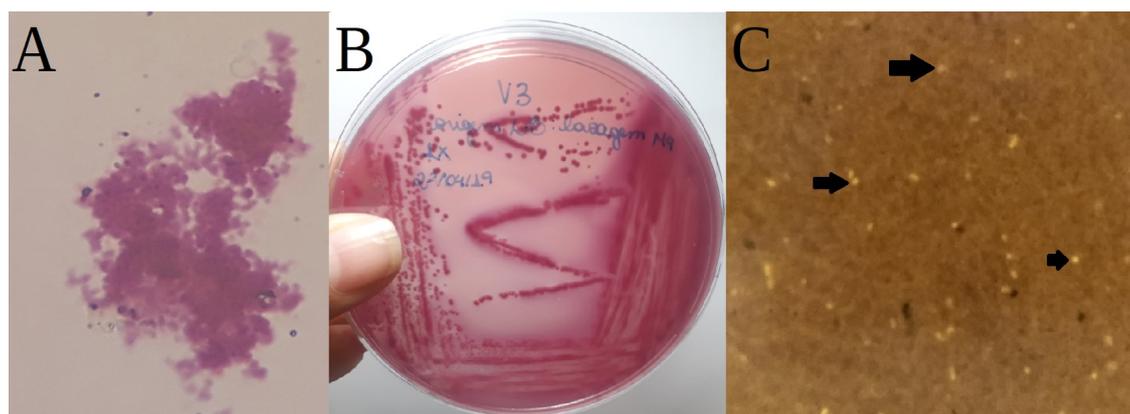


Figura 39. Caracterização morfológica inicial do isolado V3. A- micrografia de ensaio de gram, B- cultura em meio MacConkey. C- Micrografia de contrastação negativa do isolado V3 por tinta nanquim. Setas negras em C apontam para diferentes células bacterianas.

A triagem bioquímica da bactéria em meio Rugai com Lisina apresentou os resultados dispostos na tabela 5.

Tabela 5. Resultado de triagem bioquímica do isolado V3 em meio Rugai com Lisina após 24 h de incubação a 25°C.,

IND	LTD	SAC	GÁS	GLI	H ₂ S	LIS	MOT	URE
-	-	+	+	+	-	-	+	-

Onde IND representa produção de Indol, LTD desaminação de triptofano, SAC fermentação de sacarose, GÁS produção de gás, GLI fermentação de glicose, H₂S produção de gás sulfídrico, LIS descarboxilação de lisina, MOT presença de motilidade, URE hidrólise de ureia, + presença, - ausência.

De acordo com o resultado da triagem bioquímica, o microrganismo pode ser classificado como *Enterobacter* sp. No entanto, a bula do fabricante indica que essa triagem é capaz de identificar, de forma presuntiva, bactérias de interesse médico. O resultado de PCR para fragmento do gene rRNA 16S aponta para o isolado como pertencente ao gênero *Klebsiella* e os resultados de análises genômicas apontam para a identificação da espécie como *K. pneumoniae*.

15.2 ANTIBIOGRAMA

Já no ensaio de antibiograma, a cepa KpV3 se mostrou sensível à classe dos aminoglicosídeos, e resistente para os demais antibióticos testados (tabela 6). Assim, considerando ainda a divisão de classes de antibacterianos descrita por Magiorakos e colegas (157), o isolado KpV3 se mostra resistente às classes de penicilinas associadas a inibidores de beta-lactamase, cefalosporinas, carbapenems, monobactâmicos e quinolonas, sendo assim um isolado MDR.

Tabela 6: Resultados de antibiograma para KpV3.

Aminoglicosídeos			monobactam	Cefalosporinas		Quinolonas				Carbapenemas		
AMI	GEN	TOB	ATM	CPM	OFX	NOR	CIP	LEV	LOM	IPM	MER	PIT
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Onde "+" denota suscetibilidade e "-" denota resistência.

Testes de antibiograma não são suficientes por si só para a demonstração de resistência a carbapenems. Como ensaio laboratorial, é necessário o teste de sinergia com disco duplo, no qual um disco é embebido com um inibidor de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), como ácido clavulânico e um segundo disco é colocado próximo a esse, embebido com uma cefalosporina, em uma placa de meio Müller-Hinton. Para esse teste, caso o halo de inibição de crescimento bacteriano cresça na região entre esses dois discos, é indicativo que a suposta

resistência a carbapenems se deve a ESBL, em vez de uma carbapenemase (161). No entanto, achados genômicos discutidos adiante permitem a classificação do isolado como resistente a carbapenems.

15.3 TIPAGEM MOLECULAR E GENES DE VIRULÊNCIA

No que diz respeito a tipagem molecular do isolado, esse teve seus *loci* de biossíntese capsular e de antígeno O classificados como KL45 e O1, respectivamente pelo programa Kaptive. O sorotipo O1 está relacionado a maior resistência a elementos do sistema complemento do soro, bem como a disseminação de cepas bacterianas pela circulação sanguínea. Esse último fenômeno contribui para a formação de abscessos piogênicos no fígado, bem como a maior letalidade em modelos murinos de infecção (162). Esse sorotipo também está mais associado às linhagens hipervirulentas de *K. pneumoniae*, em conjunto com o sorotipo O2, do que os demais sorotipos (88). Em contraste, o *locus* capsular KL45 não possui até o momento registros quanto a sua importância como um fator de virulência para a espécie. Para a tipagem MLST de *K. pneumoniae*, são comparadas as sequências dos alelos para os genes *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *tonB* de um dado isolado com o banco de sequências BIGsdb (<https://bigsdbsdb.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Mediante a análise *in silico*, os alelos dos genes *gapA* e *pgi* do isolado V3 não encontraram correspondência no banco de dados, o que caracteriza o isolado como uma nova linhagem tipo (ST). Dessa forma, a linhagem KpV3 teve seu genoma depositado no referido banco de dados e a ele foi atribuído o ST 5236.

Em relação aos fatores de virulência, além do *locus* capsular já identificado pelo programa Kaptive, a busca no banco de dados VFDB permitiu a identificação dos *loci* completos para biossíntese de enterobactina, fímbrias tipo 1 e tipo 3, como esperado. Além disso, foram detectados os genes *acrA* e *acrB*, os quais codificam uma bomba de efluxo heterodimérica, a qual possibilita a expulsão de peptídeos antimicrobianos do hospedeiro para fora da célula bacteriana (163). Curiosamente, foram encontrados todos os genes estruturais para a produção de T6SS, com exceção do gene de ATPase *tssA*. Inspeção manual do genoma pelo navegador Artemis indica a presença de três possíveis genes de toxinas efetoras para o T6SS, esses chamados de *vgrGs*. Storey e colaboradores (123) mostram que a diversidade nos *loci* gênicos para T6SS independe das distâncias filogenéticas de linhagens de *K. pneumoniae*,

o que para os autores é indicativo de recombinações frequentes para essas regiões. Um evento de recombinação ou falha na anotação do genoma podem ser responsáveis pela não-detecção da ATPase responsável pela secreção no sistema, bem como dos genes de regulação da expressão do sistema. Eles também caracterizaram a toxina *vgrg4*, a qual codificava um domínio descrito até então como DUF2345 (do inglês, *domain of unknown function*). No artigo, os autores mostram que o DUF2345 da proteína *Vgrg4* era responsável por citotoxicidade em outras linhagens de *Klebsiella*, bem como em fungos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*), além da lagarta modelo *Galleria mellonella* ao causar estresse oxidativo nestas células. A predição de domínios proteicos codificados nos genes *vgrg* do isolado KpV3 mostra que esses possuem o DUF2345 (figura 40), o que poderia ter ajudado a bactéria a competir no ambiente aquático onde ela foi isolada ou em algum contexto pretérito.

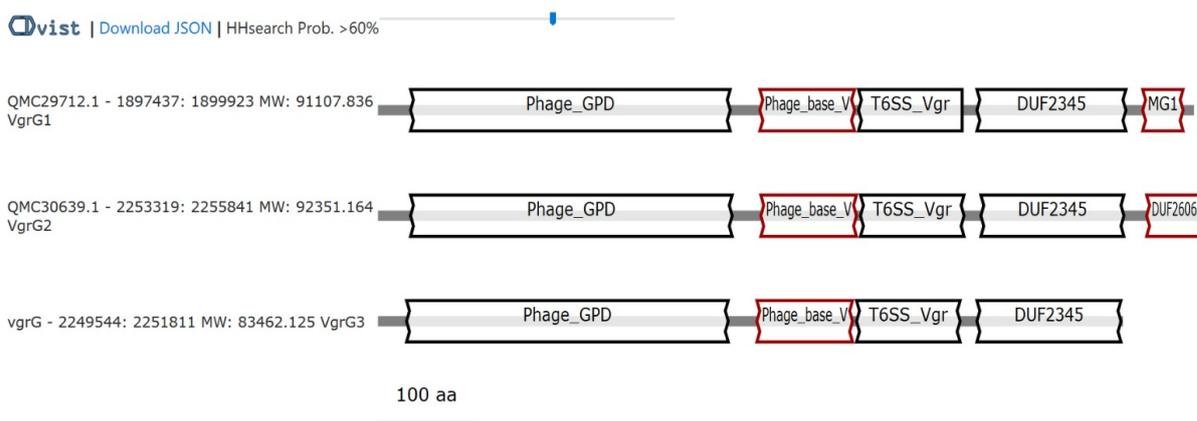


Figura 40. Predição de domínios proteicos codificados a partir dos genes *vgrg* de KpV3 no programa CDvist. Os domínios relativos a bacteriófagos ocorrem pois há semelhança estrutural entre proteínas do bacteriófago para injeção de seu genoma em bactérias e o sistema de secreção tipo 6. O domínio DUF2345 corresponde ao domínio de citotoxicidade das proteínas codificadas.

Também foi identificado o gene *iroE*, componente do grupo de genes de biossíntese de salmoquelina, no entanto, os demais genes do grupo não foram identificados. Desta forma, não foram identificados no isolado kpV3 genes para a produção de hipercápsula, hipermucoviscosidade ou produção de sideróforos acessórios, além de *iroE*, o que indica que o isolado kpV3 não possui hipervirulência. Apesar do resultado positivo para motilidade para a cepa no ensaio bioquímico, não foi possível a identificação de genes relacionados à motilidade, tais como genes associados à biossíntese de flagelo. Nesse aspecto, são necessários mais estudos para validar a suposta presença de motilidade na cepa e quais os

mecanismos pelos quais a cepa apresenta esse fenótipo, tais como o isolamento da maquinaria de locomoção da bactéria e sua identificação por métodos como a proteômica. Carabarin-Lima e colegas (164) reportam um isolado supostamente de *K. pneumoniae* com motilidade e presença de genes flagelares, como *fliC*, *fliA* e *fliH*. No entanto, a identificação deste isolado se deu por meio de sequenciamento dos genes 16 rRNA e *rpoB* apenas, o que está aquém dos métodos atuais para identificação em nível de espécie para o gênero *Klebsiella*.

15.4 GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E ELEMENTOS GÊNICOS MÓVEIS

Já em relação a genes de resistência, foram detectados os genes *KdeA*, *emrD*, *oqxAB* e *acrAB*, todos os quais codificam bombas de efluxo. *KdeA* está ligada a resistência por cloranfenicol e norfloxacin (163). Já a bomba de efluxo *oqxAB* está ligada a resistência a antimicrobianos das classes quinoxalinas, quinolonas, nitrofuranos, bem como a detergentes (166). *EmrD* está relacionada a resistência a tetraciclinas e cloranfenicol (167). Por fim, *acrAB* está relacionada a resistência a fluoroquinolonas e é mais frequentemente expressa em bactérias MDR (166). Também foram encontradas mutações nos genes de porina *ompK35* e *ompK36*, os quais assim contribuem para resistência a beta-lactâmicos (Fajardo-Lubián et al, 2019) (167), bem como no gene *acrR*, o qual é repressor transcricional dos genes *acrAB*. (tabela 7)

Tabela 7. Tabela de mutações pontuais derivada da análise do programa Resfinder

Mutation	Nucleotide change	Amino acid change	Resistance	PMID
acrR p.P161R	CCG -> CGG	P -> R	fluoroquinolone	12936981
acrR p.G164A	GGC -> GCC	G -> A	fluoroquinolone	12936981
acrR p.F172S	TTC -> TCC	F -> S	fluoroquinolone	12936981
acrR p.R173G	CGA -> GGG	R -> G	fluoroquinolone	12936981
acrR p.L195V	CTC -> GTC	L -> V	fluoroquinolone	12936981
acrR p.F197I	TTT -> ATT	F -> I	fluoroquinolone	12936981
acrR p.K201M	AAG -> ATG	K -> M	fluoroquinolone	12936981
ompK36 p.N49S	AAC -> AGC	N -> S	cephalosporins	25245001
ompK36 p.L59V	CTT -> GTA	L -> V	cephalosporins	25245001
ompK36 p.L191S	CTG -> AGC	L -> S	cephalosporins	25245001
ompK36 p.F207W	TTC -> TGG	F -> W	cephalosporins	25245001

ompK36 p.A217S	GCT -> TCT	A -> S	carbapenem	25245001
ompK36 p.N218H	AAC -> CAC	N -> H	carbapenem	25245001
ompK36 p.D224E	GAT -> GAG	D -> E	cephalosporins	25245001
ompK36 p.L228V	CTG -> GTT	L -> V	cephalosporins	25245001
ompK36 p.E232R	GAA -> CGT	E -> R	cephalosporins	25245001
ompK37 p.I70M	ATT -> ATG	I -> M	carbapenem	22282462
ompK37 p.I128M	ATT -> ATG	I -> M	carbapenem	22282462
ompK37 p.N230G	AAC -> GGC	N -> G	carbapenem	22282462

Mutações e nos genes *acrR*, *ompK36* e *ompk47* contribuem para fenótipo de resistência a antimicrobianos.

Também foram encontrados os genes *fosA*, de resistência a fosfomicina, além dos genes de resistência a metais pesados *fieF* (ferro) e *arsC* (arsênico). Em destaque, foi detectado no cromossomo bacteriano o gene *CTX-M-15* e, no contig 7, o gene *KPC-2*, uma ESBL e uma carbapenemase respectivamente, além da beta-lactamase *SHV-121*.

Mediante o uso do programa Phigaro, foram encontradas quatro sequências de profagos não-transponíveis, todas no cromossomo bacteriano. As sequências correspondem aos intervalos 227917-257232, 1861260-1904084, 2649108-2692722 e 4695694-4734428, as duas primeiras pertencendo à família viral Siphoviridae e as duas últimas à família Myoviridae. Ambas as famílias virais são comumente associadas a microbiotas intestinais de mamíferos e também a amostras aquáticas poluídas com material fecal (168). Assim sendo, é ao menos plausível que, em algum momento de sua ancestralidade, a linhagem da qual decorre o isolado KpV3 esteve em contato com componentes da microbiota intestinal humana. Além disso, o gene *CTX-M-15* se encontra a uma distância genômica relativamente curta (3,3 kb) da sequência de profago de Siphovírus de extensão 2649108-2692722, o que pode estar relacionado a aquisição desse gene de resistência por transdução.

Já em relação à estrutura do genoma, foram obtidos 7 contigs ao final da montagem, o que é indicativo de que há 6 elementos extracromossomais no genoma do isolado KpV3. O programa plasmidfinder detectou apenas dois grupos de incompatibilidade, ColRNAI e IncU, relativos aos contigs 6 e 7, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados de identificação de plasmídeos a partir do programa Plasmidfinder.

Banco de dados	Plasmídeos	Identidade	Query. Template- Comprimento	Contig	Posição no contig	Número de acesso
enterobacteriaceae	ColRNAI	100	130 / 130	contig_6_segme nt0	9096..9225	DQ298019

enterobacteriaceae	IncU	98.94	565 / 565	contig_6:1.0- 9263.0 contig_7_segme nt0 contig_7:1.0- 17402.0	14604..15167	DQ401103
--------------------	------	-------	-----------	--	--------------	----------

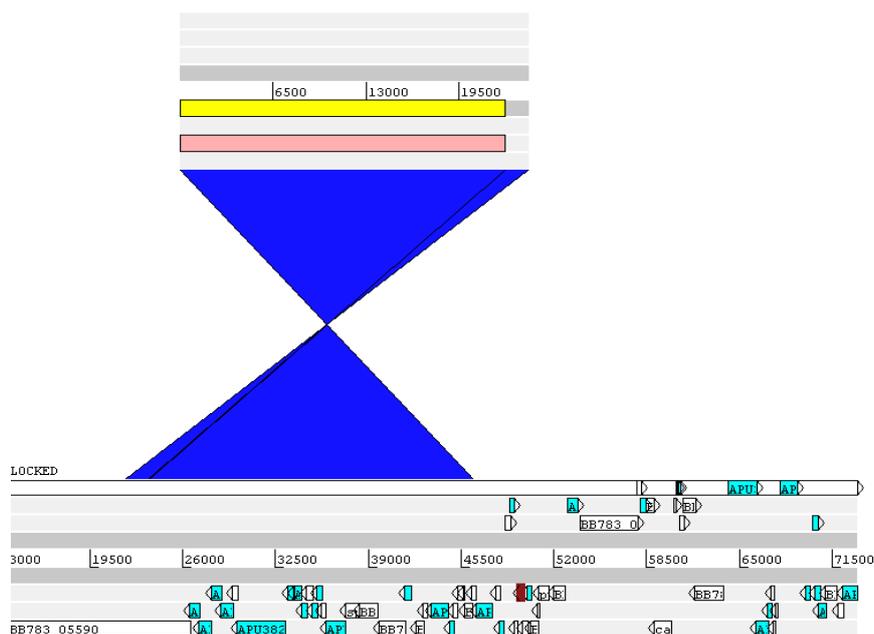
O *contig* 4 é composto inteiramente pela repetição oito vezes da sequência: (AGGTATCAACTGTTACTGTCACGTCTGCATCTGCAACATCCACGTTACCTTGTGGA TCGACTGCTTCTGCATGGATCGCTACAGGGCCTTCGCCTGTGACAGGAATCGCTGC TGTGATGAAGCCGTTAGTAAGGTCAGCTGCTGTCACGGTGTAGTTAGTACCGTTCA CATTCACTACTGTGCCGTCGATTGCATCTGGTCCCAACGCCACTTGTGCATTGAAG GTACCGTCTGTGCCTAGCTCGTCTGCATTTAAGATACCGTCGCCATTTAAGTCTTCA GGAATCGTGATCGCACCGATCAGGTCTGCAGGTA), sendo, portanto, um artefato de montagem. Experimentos *in vitro* são necessários para a enumeração exata dos plasmídeos para o isolado, tais como a eletroforese em gel de campo pulsado (do inglês, *pulsed field gel electrophoresis*, PFGE). Ademais, os dados listados até o momento em relação a genes de virulência e resistência a antimicrobianos se encontram na tabela 9.

Tabela 9: Sumário das características genéticas do isolado KpV3 que contribuem para os fenótipos de resistência a antimicrobianos e virulência

Isolado	KpV3
Sequência Tipo	5236
<u>Genes de resistência a antibióticos:</u>	
Beta-lactâmicos:	<i>blaCTX-M-15, blaSHV-121, blaKPC-2</i>
(Fluoro) quinolonas	<i>oqxA, oqxB</i>
Fosfomicina	<i>fosA</i>
Bombas de efluxo	<i>emrD, kdeA, acrA, acrB</i>
<u>Genes de resistência a metais pesados</u>	

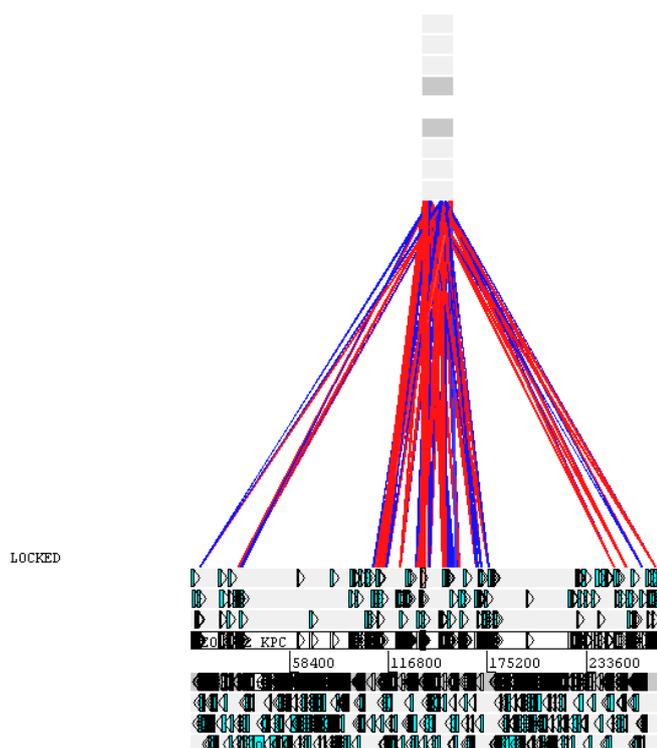
Estresse férrico	<i>fieF</i>
Arsênico	<i>arsC</i>
<u>Genes de virulência</u>	
Fímbrias tipo 1	<i>fimABCDEFGHJK</i>
Fímbrias tipo 3	<i>mrkABCDFHIJ</i>
Sistema de Secreção tipo 6	<i>tssBCDFGHIJKLM, tli1, tle1</i>
Sideróforo Enterobactina	<i>entABCEF, fepABCDG, fes, ybdA</i>
Sideróforo Salmoquelina	<i>iroE</i>
Grupos de incompatibilidade plasmidial	<i>ColRNAI, IncU</i>
Sequências de Profagos	5
Número de acesso no banco Genbank	<i>SAMN19730657</i>

Ao se observar os *contigs* no navegador genômico Artemis, a maioria dos *contigs* extracromossomais apresentou uma identidade e cobertura contínua de suas sequências com sequências depositadas no genbank (figura 41). No entanto, o *contig* 7 possui sua cobertura muito fragmentada em relação a um de seus melhores *hits* no Genbank, o que indica que a região correspondente ao *contig* 7 no genoma do isolado KpV3 é suscetível a eventos de transposição (figura 42).



1

Figura 41. Representação gráfica no navegador genômico Artemis de identidade entre *contig 3* do genoma de KpV3 e seu melhor *hit* em nBLAST. O *hit* em questão é *Klebsiella pneumoniae strain INF116-sc-2279924 plasmid unnamed2*, número de acesso em Genbank CP031794.1.



1

Figura 42. Representação gráfica em navegador genômico Artemis entre o *contig 7* do genoma de KpV3 (acima) e um de seus melhores *hits* em nBLAST. O *hit* em questão é *Escherichia coli strain E02162 plasmid pE02162_KPC*, número de acesso em Genbank MK370991.1.

Além disso, alguns genes do plasmídeo alinhado com o contig 7 estão anotados como genes de transposase e ocorrem múltiplas vezes (Figura 43).

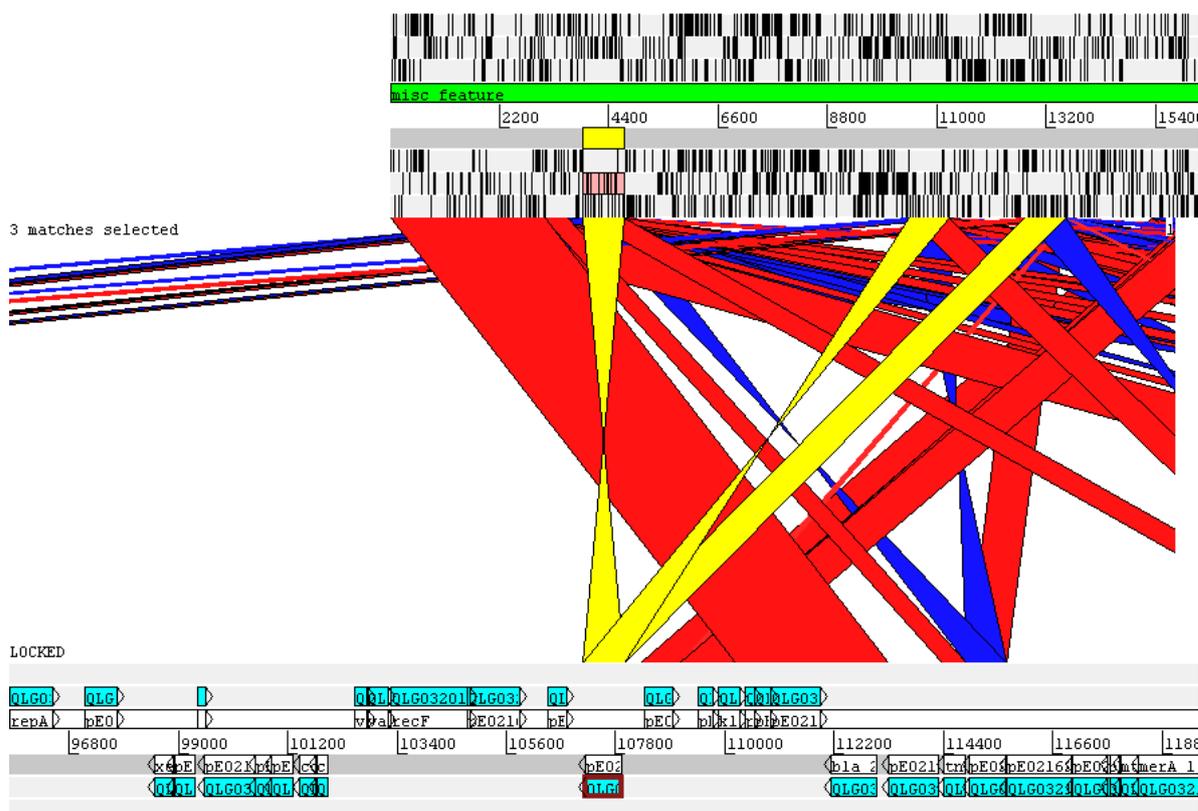


Figura 43. Representação gráfica em navegador genômico Artemis que dá destaque a ocorrência múltipla de hits entre o contig 7 de Kpv3 e o plasmídeo de *E.coli* MK370991.1. As barras amarelas delimitam um exemplo, onde um gene de transposase do *hit* de nBLAST tem alta similaridade com três regiões do *contig* 7 de KpV3.

O gene *KPC-2* se encontra no *contig* 7 e, ao redor dele, estão outros genes conservados nesse alinhamento, os quais são uma versão truncada da sequência de inserção ISKpn6, uma resolvase Tn3 e uma segunda sequência de inserção, IS26. Ramos e colegas (169) descrevem o genoma de um isolado, chamado Kp13, o qual foi responsável por um surto de infecções em uma unidade de terapia intensiva em londrina. O isolado possuía um plasmídeo do grupo *IncU*, o qual também possuía o gene *KPC-2* e os genes circundantes descritos acima. No entanto, o sucesso de infecções do isolado Kp13 também se deu por conta de outros fatores ausentes no isolado Kpv3, como o grupo de genes necessário para a biossíntese de yersiniabactina e genes de 16S rRNA metiltransferases. Um plasmídeo com *KPC-2* e do grupo *IncU* também foi encontrado em um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* oriunda de um paciente de Santa Catarina (170). Ainda como Yang e colaboradores (173)

discutem, o transposon mais associado a genes de *KPC* para *K. pneumoniae* é o transposon *Tn4401*, o qual possui 10 kb e inclui, além do gene de carbapenemase, um gene de transposase *tnpA*, um gene de resolvase *tnpR* e duas sequências de inserção, *ISKpn6* e *ISKpn7*. Existem ainda transposons cuja estrutura é derivada de *Tn4401*, os quais são chamados de NTEKPCs (do inglês, *Non-Tn4401-Elements*) (171, 172). Entre os NTEKPCs existem grupos de I-III, porém todos compartilham ao menos uma porção truncada da *ISKpn6*, além de um gene *KPC*. O grupo NTEKPC-III possui um gene *tnpR* de sequência distinta das demais, NTEKPC-II possuem ao menos uma versão truncada do gene *tnpR* e os demais transposons são incluídos no grupo NTEKPC-I (174). Ao se comparar a estrutura do transposon do contig 7 com dos NTEKPCs, esse estaria dentro de NTEKPC-I. No entanto, existem diferenças estruturais entre o transposon aqui detectado e os demais. Todos os NTEKPC-I descritos possuem a sequência de inserção *ISKpn8* (também anotada como *IS481-like*), exceto NTEKPC-Ic. NTEKPC-Ic também não possui a sequência de inserção *IS26*, ao contrário do transposon aqui referido. Portanto, o transposon do contig 7 configura uma potencial nova variante estrutural dentro de NTEKPC-I (figura 44). A presença de diferentes sequências de inserção entre os transposons pode se dar por eventos de recombinação ou, ao se associarem a um transposon com um gene passageiro, oferecerem menor custo adaptativo ao hospedeiro (134, 172).

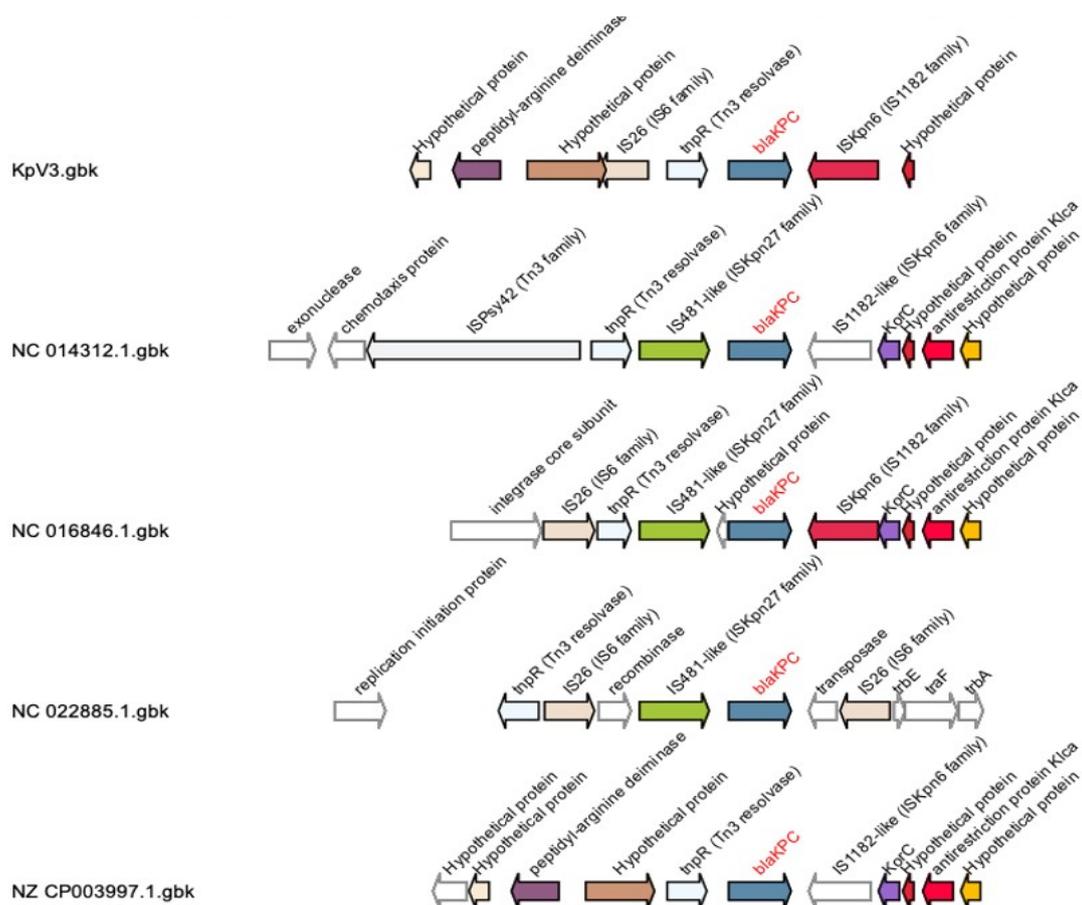


Figura 44. Composição gênica de NTEKPCs encontrados no isolado KpV3 e demais transposons do tipo na literatura. O transposon de KpV3 não possui o gene de transposase IS481-like, como a maioria dos demais. A Orientação da sequência de inserção IS26 está oposta a dos demais, e também há a presença do gene hipotético colorido na figura de cor marrom, o qual é um gene de transposase. A combinação desses fatores tornam o transposon de KpV3 uma variante nova de NTEKPC.

15.5 GENÔMICA COMPARATIVA

Em relação a comparações de demais características do genoma de KpV3 com outros isolados da espécie, outras observações interessantes acontecem. Primeiro ao se considerar as relações filogenéticas entre linhagens tipo no site BIGSdb, a ST 5236 não possui relação filogenética próxima com as STs 11, 14 e 258, as quais estão mais associadas a linhagens de relevância médica. Ao invés disso, as STs mais próximas são 874,1041, 1072 e 1128, com ST

515 como fundadora. Ainda que essas sejam as linhagens mais próximas, o ramo da ST 5236 ainda é relativamente distante das STs mais próximas, o que pode ser um indício de que podem existir linhagens não-descritas mais próximas à ST 5236 (Figura 45).

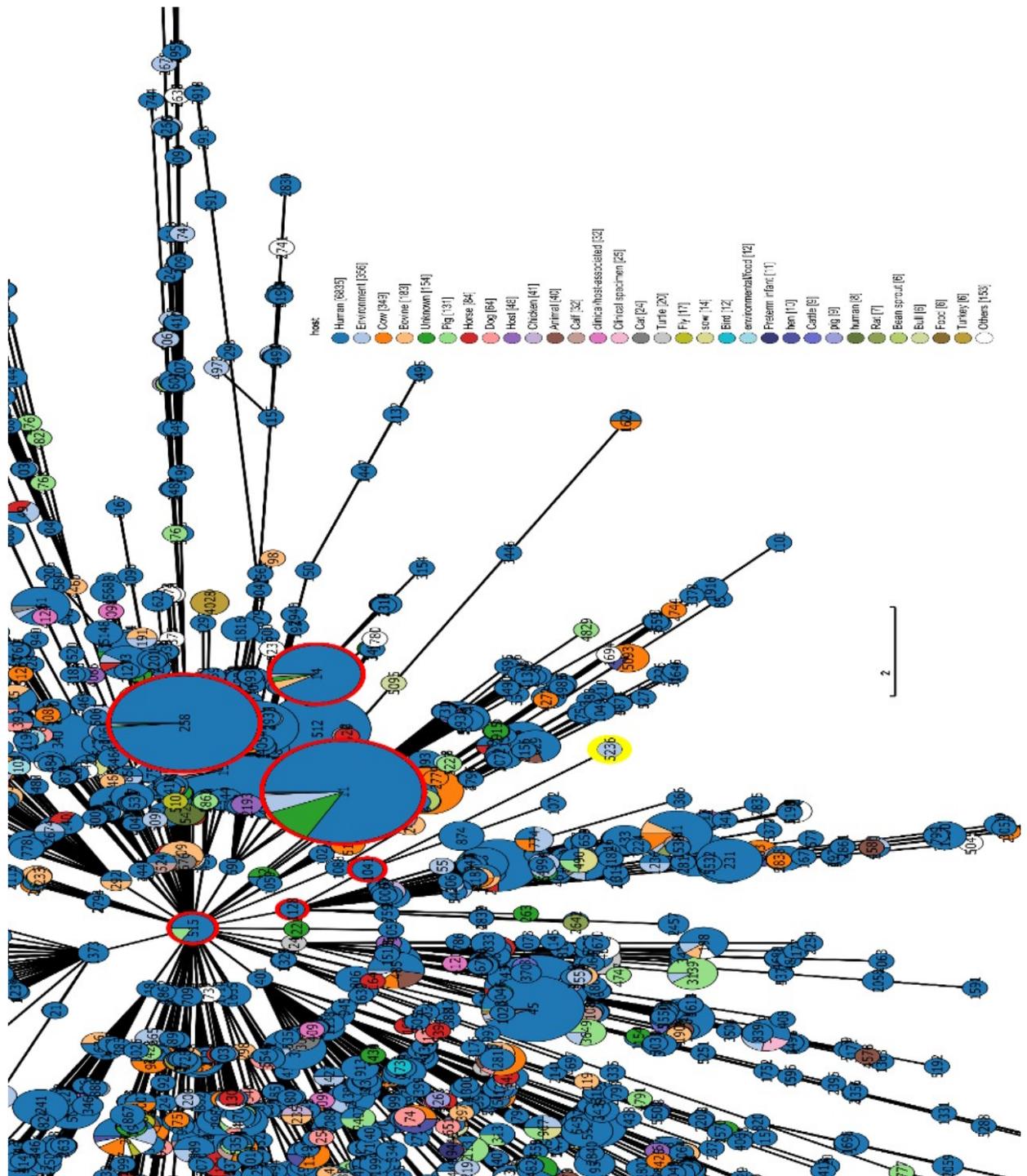


Figura 45. Arvore de STs para a espécie *K.pneumoniae* obtida a partir do banco de dados BIGSdb. A ST 5236, circulado em amarelo e representante de KpV3, é filogeneticamente distante das STs 11, 14 e 256, circuladas em vermelho e comumente associadas a linhagens epidêmicas de *K.pneumoniae*. Linhagens filogeneticamente próximas a ST 5236 também estão circuladas em vermelho.

Já ao se reconstruir a filogenia próxima de KpV3 usando genomas de *K. pneumoniae* do Genbank com valores de ANI>99%, observa-se que a linhagem Kpv3 ocupa um ramo único na árvore filogenética, o que reforça o achado de que se trata de uma linhagem nova da espécie (figura 46). Também foi incluída na filogenia o genoma da linhagem KpBSB31. Essa linhagem foi obtida anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (156), a partir de um caso de septicemia em um paciente idoso no Hospital Universitário de Brasília (HUB). A linhagem, referida no artigo como BSB-A, possuía fenótipo de hipervirulência e de resistência extensiva a antibióticos (XDR). Embora essa linhagem tenha sido isolada a partir de um local relativamente próximo ao de Kpv3, essas linhagens se encontram filogeneticamente distantes. Também nota-se que a maior parte dos genomas comparados tenha vindo de linhagens hospitalares, o que dificulta a compreensão de como linhagens de relevância médica podem estar se disseminando no meio ambiente. Danko e colegas (173) buscaram caracterizar quais são os microbiomas associados aos ambientes urbanos. Para tal, eles coletaram e analisaram mais de 4000 amostras de metagenoma obtidos a partir de 60 cidades. Ainda com essa quantidade de amostras, as curvas de rarefação de espécies e de genes de resistência a antibióticos não chegaram a uma saturação. Dessa forma, fica evidente como há diversidade microbiana a ser estudada mesmo nos ambientes mais próximos a nós, particularmente a se considerar os eventos de seleção e mobilização de genes relacionados à resistência a antimicrobianos.

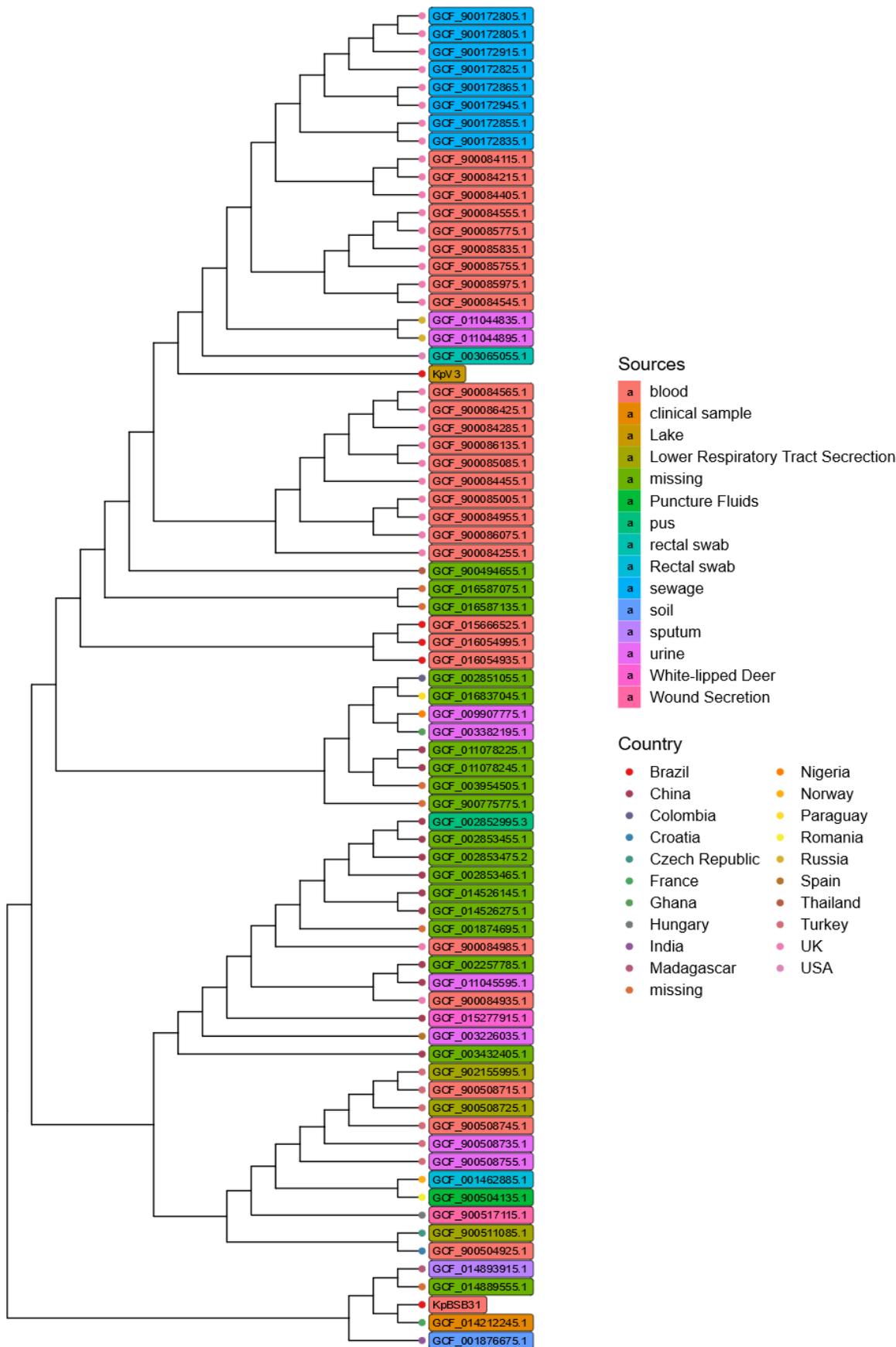


Figura 46. Filogenia de genomas de *K. pneumoniae* com valores de ANI > 99% em relação a KpV3 depositados em *Genbank*. A linhagem KpV3 encontra-se em um ramo único. A ocorrência de linhagens hospitalares nessa filogenia é consideravelmente maior que de linhagens de origem ambiental.

Apesar das linhagens KpV3 e KpBSB31 não apresentarem relações filogenéticas próximas, o alinhamento entre seus *contigs* mostra que sequências do contig 6 do isolado KpV3 são encontradas de forma virtualmente idêntica no isolado KpBSB31 (Figura 42). O replicon associado a esse contig, ColRNAI, já foi associado à presença de genes KPC e transposons Tn4401 e NTEKPCs (173), embora no isolado KpV3, esses elementos estejam em outro plasmídeo (Figura 47).

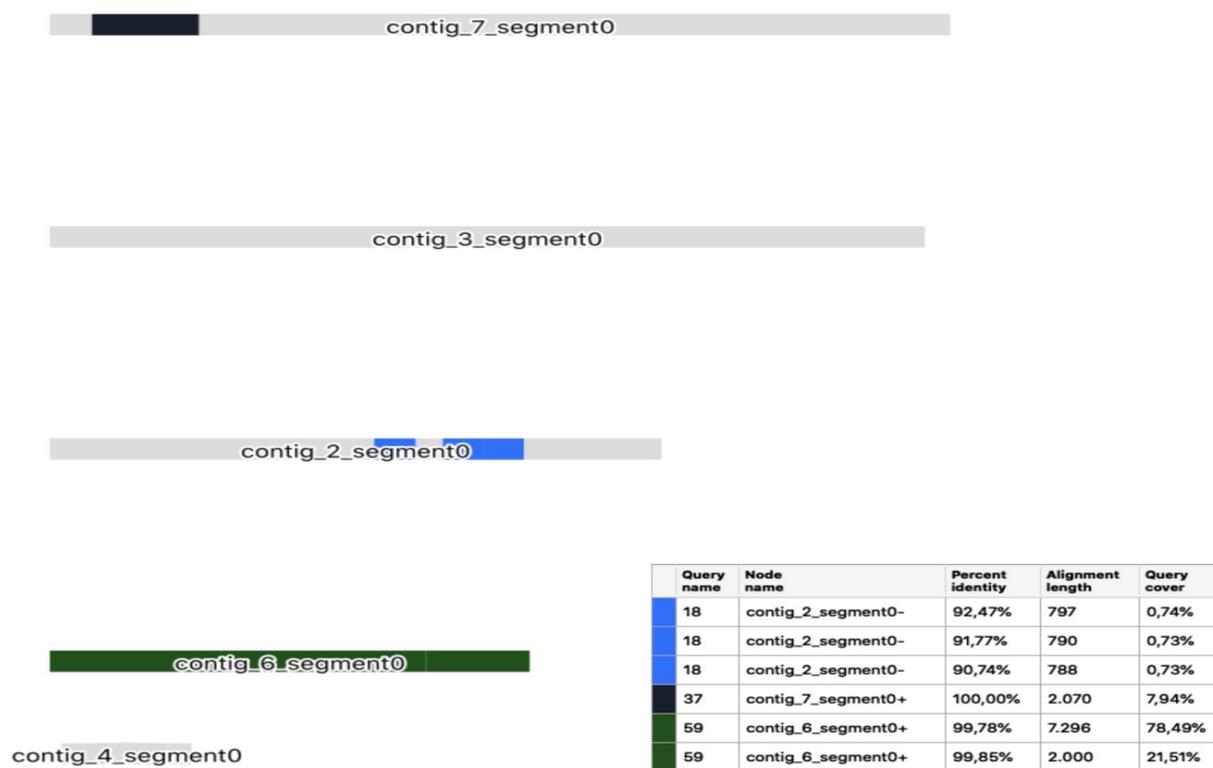


Figura 47. Índices de similaridade e cobertura entre *contigs* do genoma de Kpv3 e de KpBSB31. O contig 6 da linhagem KpV3 possui correspondência praticamente integral em contigs da linhagem hospitalar KpBSB31. A semelhança no contig 7 de KpV3 com a linhagem hospitalar se deve a elementos comuns entre seus transposons NTEKPC.

Esse achado é importante, ao que se pode levar à hipótese de que há um fluxo de genes de relevância médica entre hospitais do DF e o lago Paranoá. Outros trabalhos na literatura já foram capazes de demonstrar a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos em corpos hídricos por conta de fontes hospitalares (174–176). No entanto, são necessárias algumas considerações. Para se validar essa hipótese, seria necessário um trabalho mais abrangente de vigilância epidemiológica, ao se analisarem ao menos mais isolados ou genomas oriundos do lago Paranoá, para a detecção de genes em comum com isolados hospitalares. Dentre as técnicas para essa detecção, PCR quantitativo (qPCR) é a melhor para quantificação de um dado gene de resistência e elementos gênicos móveis

associados, mas é uma busca dirigida contra um ou poucos alvos previamente conhecidos. A metagenômica é a melhor técnica no que diz respeito a detecção de diversidade gênica associada a resistência a antimicrobianos, mas a anotação dos genes é limitada àqueles já caracterizados em bancos de dados. E a metagenômica funcional, onde fragmentos de genomas são clonados em plasmídeos e expressos em linhagens bacterianas laboratoriais, como *E. coli*, permitem a descoberta de novos genes associados a um dado fenótipo, mas pode ser uma metodologia muito laborosa. Ainda é possível se quantificar qual a proporção de isolados bacterianos cultiváveis de um ambiente que são resistentes a um antimicrobiano em relação aos sensíveis (93, 178). A quantificação de antimicrobianos e metais pesados sendo introduzidos no Lago Paranoá também é importante, uma vez que esses podem estar selecionando/co-selecionando genes de resistência (96), embora Karkman e colaboradores (179) argumentam que a poluição fecal em um ambiente aquático é fator suficiente para explicar a diversidade de genes de resistência no ambiente, sendo esses selecionados em locais anteriores ao do despejo. Ainda que a prevalência de bactérias produtoras de genes de resistência seja baixa em um dado hospital, o encanamento desse pode ser um reservatório e dispersor importante dessas bactérias, assim também sendo um local interessante para monitoramentos futuros de resistência a antimicrobianos (181). Ekwanzela e colegas (177) mostram ainda que *K. pneumoniae* podem estar mais associadas a um sedimento aquático do que na coluna d'água, o que indica que pode haver uma distribuição espacial discreta entre diferentes aspectos de um corpo aquático.

Apesar dessas considerações e do impacto que a resistência a antimicrobianos tem nas hospitalizações e óbitos por infecções bacterianas, ainda não se sabe como a presença de genes de resistência no meio ambiente impacta os despejos hospitalares. Isso é, não se sabe quais são os táxons microbianos responsáveis pelo armazenamento de genes de resistência no meio ambiente ou como a introdução de antibióticos afeta as comunidades microbianas de forma a essas se tornarem um risco maior a saúde humana. No entanto, critérios como abundância de um dado gene em um ambiente, associação com elementos gênicos móveis e membros do grupo ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli*) tem sido apontados como variáveis de risco (171). Ao se comparar genomas depositados no NCBI de *K. pneumoniae* com de outras espécies do grupo ESKAPEE, estas possuem a tendência a conter mais genes de resistência e plasmídeos, bem como genomas maiores. Esta espécie possui ainda a capacidade de colonizar diferentes nichos ecológicos, entre nichos ambientais, microbiotas de animais e humanos. Assim, essa espécie pode ser

considerada como um eixo de acumulação e transmissão de genes de resistência entre esses nichos, o que pode facilitar a transmissão de genes entre bactérias ambientais e aquelas mais restritas a microbiotas intestinais (180) (Figura 48). Dadas estas características de aquisição de genes de resistência a antimicrobianos e colonização de nichos diversos, *K. pneumoniae* já foi proposta como um indicador de poluição ambiental relativa à resistência a antimicrobianos (93). De todo modo, a presença de patógenos oportunistas em um ambiente de usufruto da população possibilita a colonização, ainda que assintomática, dessas bactérias em hospedeiros, o que pode levar a disseminação desses na comunidade. Um estudo de caso-controle na Noruega (181) aponta o nado recreativo como um fator de risco para a aquisição de *E. coli* ou *K. pneumoniae* portadoras de ESBLs. No entanto, a literatura ainda é muito limitada quanto ao risco que exposições ambientais podem ter na aquisição de bactérias resistentes a antimicrobianos.

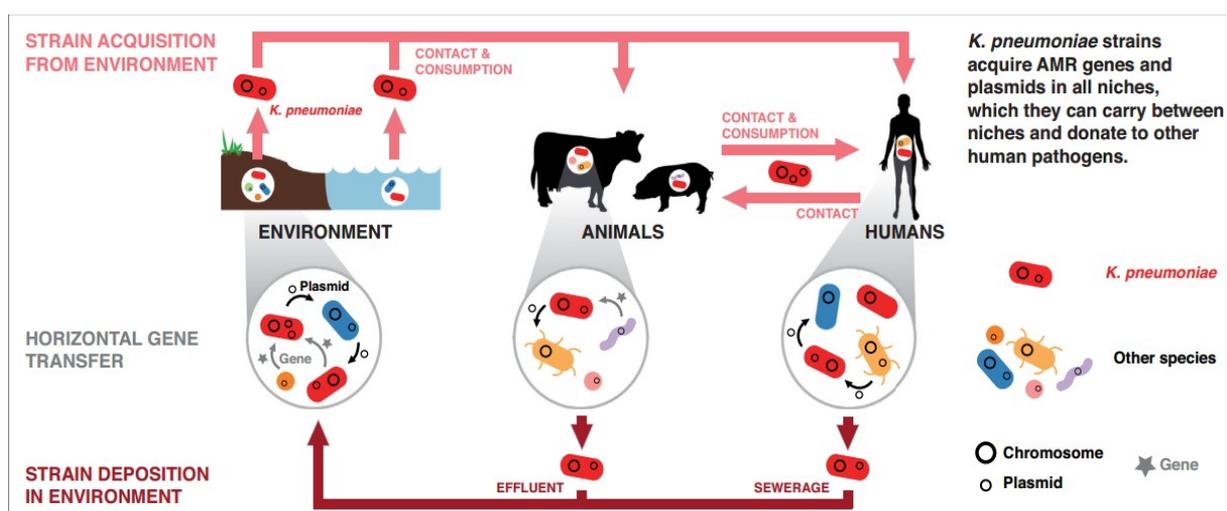


Figura 48. Dispersão de genes por *K. pneumoniae* entre diferentes biotas. Por conta de sua capacidade de colonizar solo, água e intestinos de animais, *K. pneumoniae* poderia transitar entre estes ambientes e transportar genes, particularmente em plasmídeos, para bactérias restritas a esses ambientes. Retirado de Wyres e Holt, 2018.

No Brasil, ainda são relativamente poucos os trabalhos envolvendo saúde única no contexto de resistência a antimicrobianos. Oliveira e colegas (184) descrevem uma linhagem de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 do grupo ST 11 isolada a partir de rios no estado de São Paulo. Dropa e colegas (185) detectaram linhagens à época novas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL a partir de amostras de esgoto. Cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases foram detectadas ainda em águas recreacionais marinhas no estado do Rio de

Janeiro (197–199) e enterobactérias resistentes a carbapenêmicos foram encontradas na baía de Santos (189). O site <http://onehealthbr.com/> registra genomas de bactérias de relevância médica, cujas linhagens foram isoladas dentro e fora de ambientes hospitalares. Embora existam contribuições de 10 estados e ambientes extra-hospitalares, a maior parte dos registros se dá a partir de linhagens hospitalares no estado de São Paulo.

Curiosamente, uma associação com o número de infecções cujas bactérias são resistentes a antimicrobianos tem sido feita com a temperatura de um dado local. Mcfadden e colaboradores (188) observam que o número de infecções causadas por *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* em hospitais aumenta nos Estados Unidos conforme as temperaturas mínimas das cidades aumentam. Anderson e colegas (191) mostram que em hospitais dos Estados Unidos, França, Austrália e Taiwan, o número de sepses causadas por *K. pneumoniae* aumenta conforme a temperatura aumenta nas estações. Rodriguez-Verdugo e colaboradores (192) listam convergências fisiológicas e genéticas em bactérias em face de estresses por antimicrobianos e por temperatura. Os autores citam, por exemplo, os aminoglicosídeos, que promovem a formação de proteínas com dobramento diferente do funcional, ao interferir no reconhecimento de códon-anticódon da tradução. Dessa forma, proteínas do sistema de resposta a proteínas mal dobradas (enoveladas) são ativadas, com expressão regulada positivamente de chaperonas como DnaK e GroEL. A regulação positiva dessas chaperonas também ocorre em estresse térmico em bactérias, uma vez que estresses térmicos também promovem o dobramento inadequado ou desnaturação de proteínas. Ainda segundo os autores, linhagens de *E. coli* submetidas a evolução *in vitro* desenvolvem, ao longo de gerações submetidas a estresse térmico, resistência a antimicrobianos. Collignon e colegas (193) apontam ainda para fatores socioeconômicos que podem influenciar na disseminação da resistência a antimicrobianos. Os autores citam que pouca infraestrutura, como acesso a redes de esgoto e água limpa e baixos gastos com saúde e educação por parte dos governos são correlacionados com países que apresentam maiores números de infecções causadas por bactérias resistentes a antibacterianos. Os autores encontram ainda uma correlação entre aumento de temperatura e ocorrência de resistência a antimicrobianos, embora eles discutam que não é possível afirmar se essa correlação ocorre por aproximação a outros fatores (como coincidir com países com baixo gasto em saúde) ou se é uma correlação direta.

Essa discussão acerca da associação entre resistência e temperatura se torna importante ao se considerar as mudanças no uso do Lago Paranoá pela população do Distrito Federal. Desde a segunda comissão Cruls, ainda no século 19, o botânico François Glaziou concebia a ideia de um lago artificial para o que seria na época a nova capital do país. Desde

seu represamento, o lago tinha como função social servir como ornamentação à cidade e ponto recreativo para a população, com o presidente Juscelino Kubitschek afirmando que o lago seria a “moldura líquida da cidade”. No entanto, a partir da crise hídrica de 2017, uma das medidas adotadas pelo governo distrital em resposta foi a implementação de sistemas de captação de água a partir do Lago Paranoá, inclusive para auxiliar no provimento de água potável à população (<https://www.arquivopublico.df.gov.br/lago-paranoa/>). Embora existam sistemas de tratamento ajustados à coleta de água do lago, é preocupante que, na possibilidade do lago ser um potencial reservatório de genes de resistência a antimicrobianos, esse sistema contribua para a disseminação desses. Projeções de aumento da temperatura do painel intergovernamental de mudanças climáticas (do inglês, *Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC) apontam para o aumento de temperatura e de duração da estação seca, bem como para decréscimo no volume de precipitações chuvosas para o domínio morfoclimático do Cerrado, no qual o DF está localizado (194). Assim, é necessário considerar ainda a hipótese de que mudanças socioeconômicas que levem ao reuso de água, por conta de alterações climáticas(206), podem contribuir para a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos.

16 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2

A busca por uma economia sustentável de produtos para o ser humano é um passo importante rumo ao desenvolvimento sustentável. No entanto, é preciso também não tornar cíclico o contato com poluentes nas sociedades humanas. Embora o isolado KpV3 não possua fatores genéticos para possuir o fenótipo de hipervirulência, essa possui, genes relativos a virulência clássica para a espécie, como genes para biossíntese cápsula, fimbrias e biossíntese de enterobactina e em nível genotípico e fenotípico, a multiresistência a antimicrobianos, incluindo carbapenems de último recurso.

O isolado KpV3 é correspondente a uma nova linhagem para a espécie e análises filogenéticas indicam que a proporção de linhagens ambientais de *K. pneumoniae* com genomas disponíveis em banco *Genbank* é bem menor que de linhagens hospitalares, tornando estudos destas linhagens necessários para a compreensão de resistência a antimicrobianos como um problema de saúde única.

A montagem do genoma da linhagem KpV3 por leituras longas permitiu a identificação de uma nova variedade de transposon do tipo NTEKPC para a locomoção do gene de carbapenemase *blaKPC*.

Também é de preocupação o achado de uma sequência extracromossomal ser virtualmente idêntica entre o isolado KpV3 do lago Paranoá com um isolado de origem hospitalar. No entanto, são necessários mais estudos para se avaliar qual a extensão deste suposto fluxo de genes entre hospitais e o lago Paranoá, bem como qual seria a extensão da presença de genes de resistência a antimicrobianos no lago. Os dados do capítulo 2 foram aceitos para publicação em síntese (Apêndice A)

17 BIBLIOGRAFIA

1. United Nations Secretary-General's Plan: Water Action Decade 2018-2028 Water for sustainable development.
2. World Economic Forum. The global Risks Report 2019.
3. 2nd World Water Forum. Ministerial Declaration of The Hague on Water Security in the 21st Century. 2000.
4. 8th World Water Forum. Brasília Declaration of Judges on Water Justice [10 Principle Declaration]. 2018.
5. Fowler SJ, Smets BF. Microbial biotechnologies for potable water production. *Microb Biotechnol.* setembro de 2017;10(5):1094–7.
6. Stoppani A. The Anthropozoic Era: Excerpts from *Corso di Geologia*. G. Bernardoni E. G. Brigola; 1873.
7. Vernadsky VI. *The Biosphere*. Copernicus;
8. Crutzen PJ. *Geology of mankind TheAnthropocene*. :1.
9. Dachs J, Méjanelle L. Organic Pollutants in Coastal Waters, Sediments, and Biota: A Relevant Driver for Ecosystems During the Anthropocene? *Estuaries and Coasts*. janeiro de 2010;33(1):1–14.
10. Das S, Dash HR. Microbial Bioremediation. In: *Microbial Biodegradation and Bioremediation* [Internet]. Elsevier; 2014 [citado 20 de outubro de 2021]. p. 1–21. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128000212000017>
11. Top EM, Springael D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*. junho de 2003;14(3):262–9.

12. Petrie B, Barden R, Kasprzyk-Hordern B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*. abril de 2015;72:3–27.
13. Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*. janeiro de 1998;36(2):357–93.
14. OECD. *Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*.
15. OECD. Test No. 236: Fish embryo Toxicity.
16. Sousa JCG, Ribeiro AR, Barbosa MO, Pereira MFR, Silva AMT. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of Hazardous Materials*. fevereiro de 2018;344:146–62.
17. Nunes B, Antunes SC, Santos J, Martins L, Castro BB. Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotoxicology and Environmental Safety*. setembro de 2014;107:178–85.
18. de Voogt P, Janex-Habibi M-L, Sacher F, Puijker L, Mons M. Development of a common priority list of pharmaceuticals relevant for the water cycle. *Water Science and Technology*. 1º de janeiro de 2009;59(1):39–46.
19. Cain RT, Clark MJR, Zorkin NR. Fraser River Estuary Study Water Quality.
20. Rodríguez-Gil JL, Cáceres N, Dafouz R, Valcárcel Y. Caffeine and paraxanthine in aquatic systems: Global exposure distributions and probabilistic risk assessment. *Science of The Total Environment*. janeiro de 2018;612:1058–71.
21. Loos R, Wollgast J, Huber T, Hanke G. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. *Anal Bioanal Chem*. 6 de fevereiro de 2007;387(4):1469–78.
22. Summers RM, Mohanty SK, Gopishetty S, Subramanian M. Genetic characterization of caffeine degradation by bacteria and its potential applications. *Microbial Biotechnology*. maio de 2015;8(3):369–78.
23. Żur J, Piński A, Marchlewicz A, Hupert-Kocurek K, Wojcieszńska D, Guzik U. Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environ Sci Pollut Res*. agosto de 2018;25(22):21498–524.
24. Litchfield C. Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime? *BioScience*. 2005;55(3):273.
25. Logsdon GS, Kohne R, Abel S, LaBonde S. Slow sand filtration for small water systems. *Journal of Environmental Engineering and Science*. setembro de 2002;1(5):339–48.
26. Tausz J, Donath P. Über die Oxydation des Wasserstoffs und der Kohlenwasserstoffe mittels Bakterien. *Physiological chemistry*. 1930;

27. Raymond R, Jamison V, Hudson J. Final Report on Beneficial Stimulation of Bacterial Activity in Ground Waters Containing Petroleum Products. 1975.
28. Garbisu C, Garaiurrebaso O, Epelde L, Grohmann E, Alkorta I. Plasmid-Mediated Bioaugmentation for the Bioremediation of Contaminated Soils. *Front Microbiol.* 9 de outubro de 2017;8:1966.
29. Bilal M, Adeel M, Rasheed T, Zhao Y, Iqbal HMN. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. *Environment International.* março de 2019;124:336–53.
30. Wang X, Aulenta F, Puig S, Esteve-Núñez A, He Y, Mu Y, et al. Microbial electrochemistry for bioremediation. *Environmental Science and Ecotechnology.* janeiro de 2020;1:100013.
31. Meysman FJR. Cable Bacteria Take a New Breath Using Long-Distance Electricity. *Trends in Microbiology.* maio de 2018;26(5):411–22.
32. Lin Q, Donghui W, Jianlong W. Biodegradation of pyridine by *Paracoccus* sp. KT-5 immobilized on bamboo-based activated carbon. *Bioresource Technology.* julho de 2010;101(14):5229–34.
33. Xiong B, Zhang Y, Hou Y, Arp HPH, Reid BJ, Cai C. Enhanced biodegradation of PAHs in historically contaminated soil by *M. gilvum* inoculated biochar. *Chemosphere.* setembro de 2017;182:316–24.
34. Zhang B, Zhang L, Zhang X. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by petroleum-degrading bacteria immobilized on biochar. *RSC Adv.* 2019;9(60):35304–11.
35. Liu J, Ding Y, Ma L, Gao G, Wang Y. Combination of biochar and immobilized bacteria in cypermethrin-contaminated soil remediation. *International Biodeterioration & Biodegradation.* maio de 2017;120:15–20.
36. Haiser HJ, Turnbaugh PJ. Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacological Research.* março de 2013;69(1):21–31.
37. Gummadi SN, Bhavya B, Ashok N. Physiology, biochemistry and possible applications of microbial caffeine degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* janeiro de 2012;93(2):545–54.
38. Kurtzman RH, Schwimmer S. Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experientia.* abril de 1971;27(4):481–2.
39. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology.* 1994;32(2):335–51.
40. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol.* maio de 2019;37(5):540–6.

41. Huang Y-T, Liu P-Y, Shih P-W. Homopolish: a method for the removal of systematic errors in nanopore sequencing by homologous polishing. *Genome Biol.* dezembro de 2021;22(1):95.
42. Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. In: Kollmar M, organizador. *Gene Prediction* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [citado 7 de abril de 2021]. p. 227–45. (Methods in Molecular Biology; vol. 1962). Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9173-0_14
43. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun.* dezembro de 2018;9(1):5114.
44. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 15 de julho de 2014;30(14):2068–9.
45. Amin S, Rastogi RP, Sonani RR, Ray A, Sharma R, Madamwar D. Bioproduction and characterization of extracellular melanin-like pigment from industrially polluted metagenomic library equipped *Escherichia coli*. *Science of The Total Environment.* setembro de 2018;635:323–32.
46. Mar da Costa NY, Boaventura GR, Mulholland DS, Araújo DF, Moreira RCA, Faial KCF, et al. Biogeochemical mechanisms controlling trophic state and micropollutant concentrations in a tropical artificial lake. *Environ Earth Sci.* maio de 2016;75(10):854.
47. Goetghebuer L, Servais P, George IF. Carbon utilization profiles of river bacterial strains facing sole carbon sources suggest metabolic interactions. *FEMS Microbiology Letters* [Internet]. 1º de maio de 2017 [citado 21 de outubro de 2021];364(10). Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/doi/10.1093/femsle/fnx098/3814097>
48. Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. *Klebsiella variicola*, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. *Systematic and Applied Microbiology.* janeiro de 2004;27(1):27–35.
49. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Diallo TA, Criscuolo A, Brisse S. Description of *Klebsiella africanensis* sp. nov., *Klebsiella variicola* subsp. *tropicalensis* subsp. nov. and *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* subsp. nov. *Research in Microbiology.* abril de 2019;170(3):165–70.
50. Rodríguez-Medina N, Barrios-Camacho H. *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. 2019;17.
51. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, organizadores. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2006 [citado 21 de outubro de 2021]. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/0-387-30746-X>
52. Solomon SA, Bharadwaj AR, Singh NK, Wood JM, Debieu M, O’Hara NB, et al. Draft Genome Sequences of *Klebsiella* Species Isolated from the International Space Station. Baltrus DA, organizador. *Microbiol Resour Announc* [Internet]. 15 de outubro de 2020

- [citado 21 de outubro de 2021];9(42). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MRA.00923-20>
53. Higgins J, Hohn C. Effects of prevalent freshwater chemical contaminants on in vitro growth of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Environmental Pollution*. março de 2008;152(2):259–66.
 54. Blin C, Passet V, Touchon M, Rocha EPC, Brisse S. Metabolic diversity of the emerging pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae*: Metabolic diversity of *Klebsiella pneumoniae*. *Environ Microbiol*. maio de 2017;19(5):1881–98.
 55. Marshall SJ, White GF. Complete Denitration of Nitroglycerin by Bacteria Isolated from a Washwater Soakaway. *Appl Environ Microbiol*. junho de 2001;67(6):2622–6.
 56. Shukor MY, Husin WSW, Rahman MFA, Shamaan NA, Syed MA. Isolation and characterization of an SDS-degrading *Klebsiella oxytoca*. 2009;6.
 57. Yu L, Cao M, Wang P, Wang S, Yue Y, Yuan W, et al. Simultaneous Decolorization and Biohydrogen Production from Xylose by *Klebsiella oxytoca* GS-4-08 in the Presence of Azo Dyes with Sulfonate and Carboxyl Groups. Kelly RM, organizador. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 15 de maio de 2017 [citado 21 de outubro de 2021];83(10). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00508-17>
 58. Dada N, Sheth M, Liebman K, Pinto J, Lenhart A. Whole metagenome sequencing reveals links between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors. *Sci Rep*. dezembro de 2018;8(1):2084.
 59. Ma L, Hu T, Liu Y, Liu J, Wang Y, Wang P, et al. Combination of biochar and immobilized bacteria accelerates polyacrylamide biodegradation in soil by both bio-augmentation and bio-stimulation strategies. *Journal of Hazardous Materials*. março de 2021;405:124086.
 60. Madyastha KM, Sridhar GR. A Novel Pathway for the Metabolism of Caffeine by a Mixed Culture Consortium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. agosto de 1998;249(1):178–81.
 61. Brockhurst MA, Harrison E, Hall JPJ, Richards T, McNally A, MacLean C. The Ecology and Evolution of Pangenomes. *Current Biology*. outubro de 2019;29(20):R1094–103.
 62. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci USA*. 7 de julho de 2015;112(27):E3574–81.
 63. De Gusseme B, Vanhaecke L, Verstraete W, Boon N. Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. *Water Research*. fevereiro de 2011;45(4):1829–37.
 64. Solano F. Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New Journal of Science*. 18 de março de 2014;2014:1–28.

65. Moss GP, Smith PAS, Tavernier D. GLOSSARY OF CLASS NAMES OF ORGANIC COMPOUNDS AND REACTIVE INTERMEDIATES BASED ON STRUCTURE. *Pure & Appl Chem.* 1995;67:1307–75.
66. Fischer V, West PR, Harman LS, Mason RP. Free-Radical Metabolites of Acetaminophen and a Dimethylated Derivative. :11.
67. Fischer V, West PR, Nelson SD, Harvison PJ, Mason RP. Formation of 4-aminophenoxy free radical from the acetaminophen metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine. *Journal of Biological Chemistry.* setembro de 1985;260(21):11446–50.
68. Yoon E, Babar A, Choudhar M, Kutner M, Pysopoulos N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *JCTH [Internet].* 28 de junho de 2016 [citado 21 de outubro de 2021];4(2). Disponível em: <http://www.xiahepublishing.com/ArticleFullText.aspx?sid=2&jid=1&id=10.14218%2fJCTH.2015.00052>
69. D’Alba L, Shawkey MD. Melanosomes: Biogenesis, Properties, and Evolution of an Ancient Organelle. *Physiological Reviews.* 1º de janeiro de 2019;99(1):1–19.
70. Pralea I-E, Moldovan R-C, Petrache A-M, Ilieş M, Hegheş S-C, Ielciu I, et al. From Extraction to Advanced Analytical Methods: The Challenges of Melanin Analysis. *IJMS.* 13 de agosto de 2019;20(16):3943.
71. Sajjan S. Purification and Physicochemical Characterization of Melanin Pigment from *Klebsiella* sp. GSK. *J Microbiol Biotechnol.* novembro de 2010;20(11):1513–20.
72. Greaves JS, Richards AMS, Bains W, Rimmer PB, Sagawa H, Clements DL, et al. Phosphine gas in the cloud decks of Venus. *Nat Astron.* julho de 2021;5(7):655–64.
73. Watt AAR, Bothma JP, Meredith P. The supramolecular structure of melanin. *Soft Matter.* 2009;5(19):3754.
74. Cordero RJB, Vij R, Casadevall A. Microbial melanins for radioprotection and bioremediation. *Microb Biotechnol.* setembro de 2017;10(5):1186–90.
75. Pavan ME, López NI, Pettinari MJ. Melanin biosynthesis in bacteria, regulation and production perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* fevereiro de 2020;104(4):1357–70.
76. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introdução a Espectroscopia.* 4º ed. Cengage learning;
77. Saadatkhan N, Carillo Garcia A, Ackermann S, Leclerc P, Latifi M, Samih S, et al. Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA. *Can J Chem Eng.* janeiro de 2020;98(1):34–43.
78. Singh S, Nimse SB, Mathew DE, Dhimmarr A, Sahastrabudhe H, Gajjar A, et al. Microbial melanin: Recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications. *Biotechnology Advances.* maio de 2021;107773.
79. Wells T, Ragauskas AJ. Biotechnological opportunities with the β -ketoadipate pathway. *Trends in Biotechnology.* dezembro de 2012;30(12):627–37.

80. Ahmad S, Mohammed M, Mekala LP, Chintalapati S, Chintalapati VR. Tryptophan, a non-canonical melanin precursor: New L-tryptophan based melanin production by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. *Sci Rep.* dezembro de 2020;10(1):8925.
81. Gibello A, Suárez M, Allende JL, Martín M. Molecular cloning and analysis of the genes encoding the 4-hydroxyphenylacetate hydroxylase from *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Microbiology.* 7 de março de 1997;167(2–3):160–6.
82. Prieto MA, Perez-Aranda A, Garcia JL. Characterization of an *Escherichia coli* aromatic hydroxylase with a broad substrate range. *J Bacteriol.* abril de 1993;175(7):2162–7.
83. Huang Q, Lin Y, Yan Y. Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing *Escherichia coli* strain: Caffeic Acid Production. *Biotechnol Bioeng.* dezembro de 2013;110(12):3188–96.
84. Lin Y, Yan Y. Biotechnological production of plant-specific hydroxylated phenylpropanoids: Biological Hydroxylation of Phenylpropanoids. *Biotechnol Bioeng.* setembro de 2014;111(9):1895–9.
85. Shen X, Zhou D, Lin Y, Wang J, Gao S, Kandavelu P, et al. Structural Insights into Catalytic Versatility of the Flavin-dependent Hydroxylase (HpaB) from *Escherichia coli*. *Sci Rep.* dezembro de 2019;9(1):7087.
86. Chen W, Yao J, Meng J, Han W, Tao Y, Chen Y, et al. Promiscuous enzymatic activity-aided multiple-pathway network design for metabolic flux rearrangement in hydroxytyrosol biosynthesis. *Nat Commun.* dezembro de 2019;10(1):960.
87. Rojo F, Pieper DH, Engesser KH, Knackmuss HJ, Timmis KN. Assemblage of Ortho Cleavage route for simultaneous degradation of chloro and methylaromatics. *Science.* 1987;238:1395–8.
88. Deng Y, Faivre B, Back O, Lombard M, Pecqueur L, Fontecave M. Structure and functional characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Escherichia coli*. *ChemBioChem.* 2019;10.
89. Goiran C, Bustamante P, Shine R. Industrial Melanism in the Seasnake *Emydocephalus annulatus*. *Current Biology.* agosto de 2017;27(16):2510-2513.e2.
90. Forbes BA. “Did I Hear You Correctly? The Organism Identified Was *Corynebacterium diphtheriae*?” *Clinical Microbiology Newsletter.* março de 2017;39(5):35–41.
91. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, et al. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. Neyrolles O, organizador. *PLoS ONE.* 25 de março de 2009;4(3):e4982.
92. Brisse S, Passet V, Grimont PAD. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 1º de setembro de 2014;64(Pt_9):3146–52.

93. Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, et al. Whole-Genome Sequencing of a Human Clinical Isolate of the Novel Species *Klebsiella quasivariicola* sp. nov. *Genome Announc* [Internet]. 19 de outubro de 2017 [citado 23 de outubro de 2021];5(42). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomeA.01057-17>
94. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol*. junho de 2020;18(6):344–59.
95. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*. 15 de fevereiro de 2013;4(2):107–18.
96. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 1º de maio de 2017;41(3):252–75.
97. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019;32(3):42.
98. Flemming A. Penicillin - Nobel Lecture. 1945.
99. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale Journal of Biology and Medicine*. 2017;11.
100. Larsson DGJ, Flach C-F. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 4 de novembro de 2021 [citado 11 de novembro de 2021]; Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00649-x>
101. Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol*. maio de 2015;13(5):310–7.
102. Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol*. setembro de 2019;4(9):1432–42.
103. Destoumieux-Garzón D, Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, et al. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Front Vet Sci*. 12 de fevereiro de 2018;5:14.
104. Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. julho de 2016;110(7):377–80.
105. Baquero F, Coque TM, Martínez J-L, Aracil-Gisbert S, Lanza VF. Gene Transmission in the One Health Microbiosphere and the Channels of Antimicrobial Resistance. *Front Microbiol*. 17 de dezembro de 2019;10:2892.
106. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in

- China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. fevereiro de 2016;16(2):161–8.
107. Brealey JC, Leitão HG, Hofstede T, Kalthoff DC, Guschanski K. The oral microbiota of wild bears in Sweden reflects the history of antibiotic use by humans. *Current Biology*. outubro de 2021;31(20):4650-4658.e6.
 108. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbio* [Internet]. 2012 [citado 7 de abril de 2021];3. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00110/abstract>
 109. Lartigue M-F, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. In Vitro Analysis of IS *Ecp1B* - Mediated Mobilization of Naturally Occurring β -Lactamase Gene *bla*_{CTX-M} of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother*. abril de 2006;50(4):1282–6.
 110. Nadimpalli ML, Marks SJ, Montealegre MC, Gilman RH, Pajuelo MJ, Saito M, et al. Urban informal settlements as hotspots of antimicrobial resistance and the need to curb environmental transmission. *Nat Microbiol*. junho de 2020;5(6):787–95.
 111. CDC. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES. 2019.
 112. Herridge WP, Shibu P, O’Shea J, Brook TC, Hoyles L. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. *Journal of Medical Microbiology*. :19.
 113. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci USA*. 10 de abril de 2018;115(15):E3463–70.
 114. Fernandés R, Amador P, Prudêncio C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol*. 2013;24(1):7–17.
 115. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Reviews*. 26 de fevereiro de 2020;33(2):e00047-19, /cmr/33/2/CMR.00047-19.atom.
 116. Pandey N, Cascella M. Beta Lactam Antibiotics. In: *StatPearls*. 2021.
 117. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. agosto de 1985;28(2):302–7.
 118. Knothe H, Antal M, Krčmery V. Imipenem and ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J antimicrob chemother*. 1987;19(1):136–8.
 119. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER*. 2001;45:11.
 120. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol* [Internet]. 13 de junho de

- 2016 [citado 23 de outubro de 2021];7. Disponível em:
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00895/abstract>
121. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* junho de 2016;6(6):a027029.
 122. Naeem A, Badshah SL, Muska M, Khan K. The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules.* 2016;21(268).
 123. GVIMS. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 23-Avaliação dos Indicadores Nacionais de Infecções Relacionadas à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana (AM), Ano 2020. 2021.
 124. GRSS. RELATÓRIO GRSS/DIVISA Nº 01/2021 ANÁLISE DAS INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE E RESISTÊNCIA MICROBIANA NOS HOSPITAIS DO DISTRITO FEDERAL - ANO 2020 -. 2021.
 125. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* setembro de 2016;80(3):629–61.
 126. Rendueles O. Deciphering the role of the capsule of *Klebsiella pneumoniae* during pathogenesis: A cautionary tale. *Mol Microbiol.* maio de 2020;113(5):883–8.
 127. Buffet A, Rocha EPC, Rendueles O. Nutrient conditions are primary drivers of bacterial capsule maintenance in *Klebsiella*. *Proc R Soc B.* 2021;10.
 128. Vij R, Cordero RJB, Casadevall A. The Buoyancy of *Cryptococcus neoformans* Is Affected by Capsule Size. Alspaugh JA, organizador. *mSphere* [Internet]. 26 de dezembro de 2018 [citado 23 de outubro de 2021];3(6). Disponível em:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00534-18>
 129. Tan YH, Chen Y, Chu WHW, Sham L, Gan Y. Cell envelope defects of different capsule-null mutants in K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* can affect bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol.* maio de 2020;113(5):889–905.
 130. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microbial Genomics* [Internet]. 1º de setembro de 2018 [citado 23 de outubro de 2021];4(9). Disponível em:
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000196>
 131. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 22 de janeiro de 2018;8:4.
 132. Vornhagen J, Bassis CM, Ramakrishnan S, Hein R, Mason S, Bergman Y, et al. A plasmid locus associated with *Klebsiella* clinical infections encodes a microbiome-dependent gut fitness factor. Mecsas J, organizador. *PLoS Pathog.* 30 de abril de 2021;17(4):e1009537.
 133. Storey D, McNally A, Åstrand M, sa-Pessoa Graca Santos J, Rodriguez-Escudero I, Elmore B, et al. *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated microbial

- competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. Parsek MR, organizador. PLoS Pathog. 19 de março de 2020;16(3):e1007969.
134. Liu L, Ye M, Li X, Li J, Deng Z, Yao Y-F, et al. Identification and Characterization of an Antibacterial Type VI Secretion System in the Carbapenem-Resistant Strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. *Front Cell Infect Microbiol*. 12 de outubro de 2017;7:442.
135. Oren A. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. Godfray HCJ, Knapp S, organizadores. *Phil Trans R Soc Lond B*. 29 de abril de 2004;359(1444):623–38.
136. Blount ZD, Borland CZ, Lenski RE. Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 10 de junho de 2008;105(23):7899–906.
137. Gillings MR, Stokes HW. Are humans increasing bacterial evolvability? *Trends in Ecology & Evolution*. junho de 2012;27(6):346–52.
138. Hall JPJ. Is the bacterial chromosome a mobile genetic element? *Nat Commun*. dezembro de 2021;12(1):6400.
139. Popa O, Dagan T. Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*. outubro de 2011;14(5):615–23.
140. Polz MF, Alm EJ, Hanage WP. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. *Trends in Genetics*. março de 2013;29(3):170–5.
141. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. outubro de 2018 [citado 20 de junho de 2021];31(4). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00088-17>
142. Biémont C. A Brief History of the Status of Transposable Elements: From Junk DNA to Major Players in Evolution. *Genetics*. 1º de dezembro de 2010;186(4):1085–93.
143. Datta N. Transmissible drug resistance in an epidemic strain of *Salmonella typhimurium*. *J Hyg*. setembro de 1962;60(3):301–10.
144. Sheppard AE, Stoesser N, Wilson DJ, Sebra R, Kasarskis A, Anson LW, et al. Nested Russian Doll-Like Genetic Mobility Drives Rapid Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene *bla*_{KPC}. *Antimicrob Agents Chemother*. junho de 2016;60(6):3767–78.
145. Consuegra J, Gaffé J, Lenski RE, Hindré T, Barrick JE, Tenaillon O, et al. Insertion-sequence-mediated mutations both promote and constrain evolvability during a long-term experiment with bacteria. *Nat Commun*. dezembro de 2021;12(1):980.
146. McLaughlin RN, Malik HS. Genetic conflicts: the usual suspects and beyond. Levine JD, Kronauer DJC, Dickinson MH, organizadores. *Journal of Experimental Biology*. 1º de janeiro de 2017;220(1):6–17.
147. Dawkins R. *The Selfish Gene*. New York, NY: Oxford University Press; 1989.

148. Van Valen L. A new evolutionary law. *Evol Theory*. 1973;1(1):1–30.
149. Gillings MR, Westoby M, Ghaly TM. Pollutants That Replicate: Xenogenetic DNAs. *Trends in Microbiology*. dezembro de 2018;26(12):975–7.
150. Snow J. On the mode of communication of cholera. 1855.
151. Robishaw JD, Alter SM, Solano JJ, Shih RD, DeMets DL, Maki DG, et al. Genomic surveillance to combat COVID-19: challenges and opportunities. *The Lancet Microbe*. setembro de 2021;2(9):e481–4.
152. Sims N, Kasprzyk-Hordern B. Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environment International*. junho de 2020;139:105689.
153. Ransom EM, Potter RF, Dantas G, Burnham C-AD. Genomic Prediction of Antimicrobial Resistance: Ready or Not, Here It Comes! *Clinical Chemistry*. 1º de outubro de 2020;66(10):1278–89.
154. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology. *Science*. 11 de abril de 2003;300(5617):286–90.
155. Simpson AJG, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*. julho de 2000;406(6792):151–7.
156. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology* [Internet]. abril de 2018 [citado 2 de novembro de 2021];122(1). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpmb.59>
157. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. março de 2012;18(3):268–81.
158. Chen L. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*. 17 de dezembro de 2004;33(Database issue):D325–8.
159. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*. 29 de outubro de 2019;gkz935.
160. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, et al. Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 19 de agosto de 2019;63(11):e00483-19, /aac/63/11/AAC.00483-19.atom.
161. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1º de dezembro de 2020;75(12):3491–500.

162. Starikova EV, Tikhonova PO, Prianichnikov NA, Zdobnov EM, Govorun VM. Phigaro: high throughput prophage sequence annotation. :4.
163. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. *In Silico* Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob Agents Chemother.* julho de 2014;58(7):3895–903.
164. Schwengers O, Barth P, Falgenhauer L, Hain T, Chakraborty T, Goesmann A. Platon: identification and characterization of bacterial plasmid contigs in short-read draft assemblies exploiting protein sequence-based replicon distribution scores. *Microbial Genomics.* :12.
165. Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics.* 15 de fevereiro de 2012;28(4):464–9.
166. Adebali O, Ortega DR, Zhulin IB. CDvist: a webserver for identification and visualization of conserved domains in protein sequences. *Bioinformatics.* 1º de maio de 2015;31(9):1475–7.
167. Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun.* dezembro de 2019;10(1):2182.
168. de Campos TA, Gonçalves LF, Magalhães KG, de Paulo Martins V, Pappas Júnior GJ, Peirano G, et al. A Fatal Bacteremia Caused by Hypermucousviscous KPC-2 Producing Extensively Drug-Resistant K64-ST11 *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Front Med.* 21 de setembro de 2018;5:265.
169. Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. 2014;15.
170. Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y, Lam TT. GGTREE: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. McNerny G, organizador. *Methods Ecol Evol.* janeiro de 2017;8(1):28–36.
171. Zhou Z, Alikhan N-F, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.* setembro de 2018;28(9):1395–404.
172. Sirot J. Detection of extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases by disk diffusion. *Clinical Microbiology and Infection.* dezembro de 1996;2:S35–9.
173. Hsieh P-F, Lin T-L, Yang F-L, Wu M-C, Pan Y-J, Wu S-H, et al. Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscess. Forestier C, organizador. *PLoS ONE.* 12 de março de 2012;7(3):e33155.
174. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* janeiro de 2010;54(1):177–83.

175. Carabarin-Lima A, León-Izurieta L, Rocha-Gracia R del C, Castañeda-Lucio M, Torres C, Gutiérrez-Cazarez Z, et al. First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *Journal of Medical Microbiology*. 1º de agosto de 2016;65(8):729–37.
176. Ping Y, Ogawa W, Kuroda T, Tsuchiya T. Gene Cloning and Characterization of KdeA, a Multidrug Efflux Pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(10):1962–4.
177. Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, et al. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob Resist Infect Control*. dezembro de 2019;8(1):44.
178. Smith KP, Kumar S, Varela MF. Identification, cloning, and functional characterization of EmrD-3, a putative multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Vibrio cholerae* O395. *Arch Microbiol*. dezembro de 2009;191(12):903–11.
179. Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. Expression of Multidrug Efflux Pump Genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* Clinical Isolates as a Function of Fluoroquinolone and Multidrug Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. fevereiro de 2011;55(2):921–4.
180. Fajardo-Lubián A, Ben Zakour NL, Agyekum A, Qi Q, Iredell JR. Host adaptation and convergent evolution increases antibiotic resistance without loss of virulence in a major human pathogen. Skurnik D, organizador. *PLoS Pathog*. 15 de março de 2019;15(3):e1007218.
181. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. Aziz R, organizador. *PLoS ONE*. 3 de março de 2011;6(3):e17549.
182. Ramos PIP, Picão RC, de Almeida LGP, Lima NCB, Girardello R, Vivian ACP, et al. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics*. dezembro de 2014;15(1):54.
183. Tartari DC, Zamparete CP, Martini G, Christakis S, Costa LH, Silveira AC de O, et al. Genomic analysis of an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST312 harbouring IncU plasmid-mediated blaKPC-2 isolated from ascitic fluid. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. junho de 2021;25:151–3.
184. Yang X, Dong N, Chan EW-C, Zhang R, Chen S. Carbapenem Resistance-Encoding and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Trends in Microbiology*. janeiro de 2021;29(1):65–83.
185. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in Microbiology*. dezembro de 2014;22(12):686–96.

186. Danko D, Bezdán D, Afshin EE, Ahsanuddin S, Bhattacharya C, Butler DJ, et al. A global metagenomic map of urban microbiomes and antimicrobial resistance. *Cell*. maio de 2021;S0092867421005857.
187. Lepuschitz S, Schill S, Stoeger A, Pekard-Amenitsch S, Huhulescu S, Inreiter N, et al. Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. *Science of The Total Environment*. abril de 2019;662:227–35.
188. Ekwanzala MD, Dewar JB, Kamika I, Momba MNB. Tracking the environmental dissemination of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* using whole genome sequencing. *Science of The Total Environment*. novembro de 2019;691:80–92.
189. Bleichenbacher S, Stevens MJA, Zurfluh K, Perreten V, Endimiani A, Stephan R, et al. Environmental dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rivers in Switzerland. *Environmental Pollution*. outubro de 2020;265:115081.
190. Karkman A, Pärnänen K, Larsson DGJ. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat Commun*. dezembro de 2019;10(1):80.
191. Karkman A, Do TT, Walsh F, Virta MPJ. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*. março de 2018;26(3):220–8.
192. Weingarten RA, Johnson RC, Conlan S, Ramsburg AM, Dekker JP, Lau AF, et al. Genomic Analysis of Hospital Plumbing Reveals Diverse Reservoir of Bacterial Plasmids Conferring Carbapenem Resistance. Bonomo RA, organizador. *mBio* [Internet]. 7 de março de 2018 [citado 26 de outubro de 2021];9(1). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.02011-17>
193. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. outubro de 2018;45:131–9.
194. Søråas A, Sundsfjord A, Sandven I, Brunborg C, Jenum PA. Risk Factors for Community-Acquired Urinary Tract Infections Caused by ESBL-Producing Enterobacteriaceae –A Case–Control Study in a Low Prevalence Country. Kluytmans J, organizador. *PLoS ONE*. 23 de julho de 2013;8(7):e69581.
195. Oliveira S, A.Moura R, C.Silva K, Pavez M, A.McCulloch J, Dropa M, et al. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1º de março de 2014;69(3):849–51.
196. Dropa M, Lincopan N, Balsalobre LC, Oliveira DE, Moura RA, Fernandes MR, et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. *Environ Sci Pollut Res*. março de 2016;23(5):4953–8.
197. de Araujo CFM, Silva DM, Carneiro MT, Ribeiro S, Fontana-Maurell M, Alvarez P, et al. Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. julho de 2016;60(7):4380–3.

198. Montezzi LF, Campana EH, Corrêa LL, Justo LH, Paschoal RP, da Silva ILVD, et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *International Journal of Antimicrobial Agents*. fevereiro de 2015;45(2):174–7.
199. Paschoal RP, Campana EH, Corrêa LL, Montezzi LF, Barrueto LRL, da Silva IR, et al. Concentration and Variety of Carbapenemase Producers in Recreational Coastal Waters Showing Distinct Levels of Pollution. *Antimicrob Agents Chemother*. dezembro de 2017;61(12):e01963-17, e01963-17.
200. Andrade VC, Caetano T, Mendo S, Oliveira AJFC de. Carbapenem resistant Enterobacteriaceae from port areas in São Paulo State (Brazil): Isolation and molecular characterization. *Marine Pollution Bulletin*. outubro de 2020;159:111329.
201. MacFadden DR, F.McGough S, Fisman D, Santillana M, S.Brownstein J. Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nature Climate Change*. 2018;8:6.
202. Anderson DJ, Richet H, Chen LF, Spelman DW, Hung Y, Huang AT, et al. Seasonal Variation in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection on 4 Continents. *J INFECT DIS*. março de 2008;197(5):752–6.
203. Rodríguez-Verdugo A, Lozano-Huntelman N, Cruz-Loya M, Savage V, Yeh P. Compounding Effects of Climate Warming and Antibiotic Resistance. *iScience*. abril de 2020;23(4):101024.
204. Collignon P, Beggs JJ, Walsh TR, Gandra S, Laxminarayan R. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet Planetary Health*. setembro de 2018;2(9):e398–405.
205. Bustamante M, Nardoto G, Pinto A, Resende J, Takahashi F, Vieira L. Potential impacts of climate change on biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems. *Braz J Biol*. agosto de 2012;72(3 suppl):655–71.
206. Tram VO P, Ngo HH, Guo W, Zhou JL, Nguyen PD, Listowski A, et al. A mini-review on the impacts of climate change on wastewater reclamation and reuse. *Science of The Total Environment*. outubro de 2014;494–495:9–17.

18 APÊNDICE A – PROOF DA PUBLICAÇÃO OBTIDA A PARTIR DA TESE



A Novel Multidrug Resistant, Non-Tn4401 Genetic Element-Bearing, Strain Type of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From an Urban Lake With Drinking and Recreational Water Reuse

Luis Janssen^{1*}, Felipe Marques de Almeida^{1*}, Thais Amanda Silva Damasceno¹, Rodrigo de Paula Baptista^{2,3}, Georgios Joannis Pappas Jr.¹, Tatiana Amabile de Campos¹ and Vicente de Paulo Martins^{1*}

¹ Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil, ² Center for Tropical and Emerging Global Diseases, University of Georgia, Athens, GA, United States, ³ Institute of Bioinformatics, University of Georgia, Athens, GA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Garson Nakazato,
State University of Londrina, Brazil

Reviewed by:

Caíla Caneiras,
University of Lisbon, Portugal
Wakano Ogawa,
Daichi University of Pharmacy, Japan

*Correspondence:

Vicente de Paulo Martins
vpmartins@unb.br

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 28 June 2021

Accepted: 01 November 2021

Published: xx xx 2021

Citation:

Janssen L, de Almeida FM, Damasceno TAS, Baptista RdP, Pappas GJ Jr, de Campos TA and Martins VdP (2021) A Novel Multidrug Resistant, Non-Tn4401 Genetic Element-Bearing, Strain Type of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From an Urban Lake With Drinking and Recreational Water Reuse. *Front. Microbiol.* 12:732324. doi: 10.3389/fmicb.2021.732324

Antimicrobial resistance (AMR) is an increasing and urgent issue for human health worldwide, as it leads to the reduction of available antibiotics to treat bacterial infections, in turn increasing hospital stays and lethality. Therefore, the study and genomic surveillance of bacterial carriers of resistance in and outside of clinical settings is of utter importance. A colony of multidrug resistant (MDR) bacteria identified as *Klebsiella* spp., by 16S rDNA amplicon sequencing, has been isolated from an urban lake in Brazil, during a drug-degrading bacterial prospection. Genomic analyses revealed the bacteria as *Klebsiella pneumoniae* species. Furthermore, the *in silico* Multilocus Sequence Typing (MLST) identified the genome as a new sequence type, ST5236. The search for antimicrobial resistance genes (ARGs) detected the presence of genes against beta-lactams, fosfomycin, acriflavine and efflux pumps, as well as genes for heavy metal resistance. Of particular note, an extended-spectrum beta-lactamase gene (*bla*CTX-M-15) has been detected in close proximity to *siphoviridae* genes, while a carbapenemase gene (*KPC-2*) has been found in an extrachromosomal contig, within a novel non-Tn4401 genetic element (NTE_{KPC}). An extrachromosomal contig found in the V3 isolate is identical to a contig of a *K. pneumoniae* isolate from a nearby hospital, which indicates a putative gene flow from the hospital network into Paranoá lake. The discovery of a MDR isolate in this lake is worrisome, as the region has recently undergone periods of water scarcity causing the lake, which receives treated wastewater effluent, and is already used for recreational purposes, to be used as an environmental buffer for drinking water reuse. Altogether, our results indicate an underrepresentation of environmental *K. pneumoniae* among available genomes, which may hamper the understanding of the population dynamics of the species in the environment and its consequences in the spread of ARGs and virulence genes.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, strain type, MLST, one health, water scarcity

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) recognizes antimicrobial resistance (AMR) as an urgent global issue with impending increases in mortality rates, hospitalization length and cross-contamination risks, as well as overall economic losses (World Health Organization [WHO], 2015). In spite of this problem, global antibiotic gross consumption and consumption per capita increased 65 and 39%, respectively, from 2000 to 2015. The broad-spectrum penicillins presented the highest increase, followed by cephalosporins, quinolones, and macrolides (Klein et al., 2018). In the current scenario, that antimicrobials are present in hospitals, animal production and communities, as well as, disposed of as wastewater in sewers, water and soil, the WHO emphasizes the need of a multidisciplinary, "One Health" approach to tackle this issue (World Health Organization [WHO], 2015).

Fortunately, ever since the seminal work of John Snow, pointing to a public water pump as a source of a cholera outbreak (Snow, 1855), several technologies in microbiology have been developed, from bacterial isolation and culture to next generation sequencing platforms (NGS). As such, different methodologies, in particular the so-called genomic surveillance, have become important to track the dissemination of infectious microbes and their genes of relevance among humans, humans and animals and these two and the environment. NGS can be particularly useful in order to track the ever-increasing dissemination of antimicrobial resistance genes (ARGs) (Mitchell and Simner, 2019; Ransom et al., 2020).

Among the most common ARGs, there are the beta-lactamase genes. Two of the most important classes of beta-lactamases are the extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and the carbapenemases. The CTX-M enzymes are members of the ESBLs, able to hydrolyze expanded-spectrum cephalosporins and monobactams (Cantón et al., 2012). Prevalent worldwide, the CTX-M beta-lactamases are the most common ESBLs, especially CTX-M-15 (Bevan et al., 2017; Bush and Bradford, 2020). Infections with ESBL producers often drive the prescription of carbapenems, which may promote the selection and spread of potentially untreatable carbapenemase-producing Enterobacterales (Bevan et al., 2017). Among carbapenemases, the KPC-2 and KPC-3 are the most widespread and most commonly reported genes (Stoesser et al., 2017; Zhang et al., 2020). These genes are frequently associated with mobile genetic elements (MGEs), such as plasmids and transposons. Thus far, the most common mobile element associated with *blaKPC*, at least for the species *Klebsiella pneumoniae*, is the transposon Tn4401 (Yang et al., 2021). However, different transposable elements, broadly termed non-Tn4401 genetic elements (NTE_{KPCs}) were first described by Shen et al. (2009). Since then, several NTE_{KPCs} sequences can be found deposited in GenBank, but the majority has not been formally described in articles (Yang et al., 2021). Thus, it becomes important for the study of *blaKPC* dispersal in hospitals and the community to describe them. There are reports of these elements in association with high-risk clonal group 258 lineages in Brazil (Cerqueira et al., 2019) as well as found in hospital-associated

carbapenemase-resistant bacterial outbreaks in Colombia and Chile (Rada et al., 2020; Wozniak et al., 2020) and in wastewater (Gomi et al., 2018).

In an environmental perspective, Gillings et al. (2018) have coined the term xenogenetic DNA to represent novel gene arrangements, such as (MGEs) with ARGs, whose assembly and dispersion have been promoted by human activity, in analogy to xenobiotic chemical pollutants. In another analogy, xenogenetic DNA behave like invasive species in as much as their abundance is determined not only by release and transport, but also by replication. Thus, xenogenetic DNA could be understood as a novel type of pollutant, being able to replicate, but also being generated as a consequence of human activity.

Klebsiella pneumoniae is a gram-negative rod belonging to Enterobacterales. It is also part of the ESKAPEE group of pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. and *Escherichia coli*) known for their capacity of causing nosocomial infections and ability to resist to multiple classes of antibiotics (Rice, 2008; Partridge et al., 2018). Moreover, some strains of *K. pneumoniae* are also known as hypervirulent, are community-acquired and capable to promote metastatic infections (Shon et al., 2013). Many of such strains belong to the Cluster groups (CGs) 258 and CG11. Of note, there are also strains whose phenotype has converged into acquiring both multidrug resistance and hypervirulence traits (Wyres et al., 2020).

Wyres and Holt (2018) have shown that *K. pneumoniae* have a tendency to harbor more AMR genes and plasmids than other ESKAPEE pathogens. Furthermore, the species has a broad ecological distribution, ranging from gut colonization in mammals to insects, plants, water bodies and soil. Lastly, clinically relevant lineages have been isolated from non-clinical contexts, such as domestic animals. Hence, the authors suggest that *K. pneumoniae* may serve as an important hub for acquisition and transmission, via horizontal gene transfer, of AMR genes to microbes in different environments. Because of this capacity of colonizing the animal gut and the external environment (water and soil) and of being frequent carriers of acquired resistance, Berendonk et al. (2015) propose *K. pneumoniae* as a primary bacterial indicator of AMR spread in the environment.

Taking the context of water bodies in Brazil, Oliveira et al. (2014) have isolated a KPC-2 producing *K. pneumoniae* belonging to the Sequence type (ST)11 clonal complex from rivers, which is frequently associated with hypervirulent strains. Dropa et al. (2016) have described a, at the time, new *K. pneumoniae* ST harboring CTX-M-8 beta-lactamase from a wastewater treatment plant (WWTP). Moreover, carbapenemase resistant *K. pneumoniae* have also been found in recreational waters in Rio de Janeiro (Montezzi et al., 2015; de Araujo et al., 2016; Paschoal et al., 2017) and carbapenemase resistant Enterobacterales have been found in Santos Bay (Andrade et al., 2020).

In the present study we describe a multidrug resistant (MDR) NTE_{KPC}-bearing *K. pneumoniae* strain belonging to a novel ST that has been found during a prospection

for xenobiotic-degrading bacteria in an artificial urban lake, next to a WWTP.

MATERIALS AND METHODS

Strain Isolation

A 50 mL sample was collected from the surface water of Paranoá lake (Brasília, Brazil: 15°44'27.4"S 47°52'52.8"W) and an aliquot of 50 µL was used as inoculum onto M9 minimum media containing acetaminophen as its only carbon source (90 mM Na₂SO₄, 22 mM KH₂SO₄, 18 mM NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 15 g.L⁻¹ agar, 3.3 mM acetaminophen). The resulting medium plate was incubated at 25°C for 24 h. For storage, the bacterial colony was inoculated in 5 mL of M9 liquid medium and incubated under agitation at 25°C and 180 rpm for 18 h. From this culture, 1.5 mL 25% (v/v) glycerol stocks were prepared and kept at -80°C. All samples were collected in accordance with Brazilian regulations and registered in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge - SISGen (A373E15).

Phenotypic Characterizations

An inoculum of 50 µL from the isolate culture, grown in LB medium at 25°C and 180 rpm for 18 h [10 g.L⁻¹ triptone (Kasvi), 10 g.L⁻¹ NaCl (Kasvi), 5 g.L⁻¹ yeast extract (Kasvi)] was streaked onto MacConkey agar plates (Kasvi). Rugai medium was used for the presumptive biochemical identification, according to the manufacturer's instructions (Laborclin).

The antibiotic sensitivity assay was performed using Müller-Hinton plates covered with different antibiotic-containing disks (Laborclin), including amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), tobramycin (10 µg), aztreonam (30 µg), cefepime (30 µg), ofloxacin (5 µg), norfloxacin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), levofloxacin (5 µg), lomefloxacin (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), piperacillin/tazobactam (100/10 µg), and ticarcillin/clavulanic acid (85 µg). The antibiogram procedure was conducted and interpreted according to current EUCAST guidelines¹, with *E. coli* ATCC 700336 as a negative control.

Genus Identification by 16S PCR Amplification and Sequencing

The isolate was grown in 5 mL of LB media overnight at 37°C and 180 rpm. Genomic DNA was extracted using Wizard[®] Genomic DNA purification kit (Promega), following the manufacturer's instructions. Fragments of the 16S rRNA gene were amplified by PCR from the genomic DNA using the primers RW01 (5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3') and DG74 (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'), as described in Greisen et al. (1994). PCR reactions were performed in a 25 µL total volume incubated at 95°C for 4 min, 30 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 72°C for 5 min. The resulting amplicons were subjected to Sanger sequencing in the High-Performance sequencing center at the Catholic University of Brasília.

¹<https://eucast.org/>

Next Generation Genome Sequencing

Genomic DNA was extracted following the same procedures for 16S amplification. Its integrity and purity were verified through 1% agarose gel electrophoresis and NanoDrop[™] Lite (Thermo Fisher Scientific) spectrophotometry. The DNA library was prepared using the rapid sequencing kit (RAD004) from Oxford Nanopore technologies (ONT) as per the manufacturer's instructions and the sequencing reactions were performed in a R9.4.1 flowcell for 24 h, in a MinION device. Basecall was performed using Guppy 4.4.2.

Genome Assembly and Annotation

De novo genome assembly was performed with Flye v2.8 (Kolmogorov et al., 2019) using the MpgAP pipeline v1.0² using default parameters. Additionally, the assembled genome was polished (error correction step) with Medaka³ using the *r941_min_high_g344* model. After Medaka the genome was polished once more by Homopolish using the parameters for bacteria and R9.4 flowcell models (Huang et al., 2020). Genome completeness was assessed with BUSCO v4.1.0, using the enterobacterales_odb10 dataset (Seppey et al., 2019).

Genome annotation was performed with the bacannot pipeline v2.2⁴ using 85% gene coverage and identity thresholds for virulence gene (VG) annotations. With this pipeline, AMR genes were detected with CARD-RGI (database version 3.0.7) (Alcock et al., 2019), AMRFinderPlus v3.2.1 (Feldgarden et al., 2019) and ResFinder 4.0 (Bortolaia et al., 2020) tools, while VFDB (Liu et al., 2019) was used to identify virulence factors (accessed in July 2020). Prophage sequences were predicted with Phigaro v2.3.0 (Starikova et al.). Capsule synthesis (K) and lipopolysaccharide (O) *loci* were further identified using Kaptive (Wick et al., 2018). Multilocus sequence typing (MLST) was performed with the *K. pneumoniae* MLST scheme (accessed in October 2020) (Diancourt et al., 2005). Plasmid replicons were detected with Plasmidfinder v2.1 (Carattoli et al., 2014) and Platon v1.5.0 (Schwengers et al.).

Comparative Genomics

Genome-based taxonomy analysis was performed with the Type Strain Genome Server (TYGS) (Meier-Kolthoff and Göker, 2019). FastANI (Jain et al., 2018) was used to calculate the average nucleotide identity (ANI) index against all the *K. pneumoniae* genomes from NCBI (Accessed in April 2021). Using all the genomes with at least 99 ANI score, a core genome phylogeny was reconstructed with Parsnp (Treangen et al., 2014). The resulting phylogenetic tree was visualized with ggtree (Oliveira et al., 2014) and re-rooted at midpoint for a better display. Moreover, we have added a clinical *K. pneumoniae* sample (Kp-BSB-A) that has been previously studied by our group (de Campos et al., 2018) to the dataset for comparative purposes. In order to standardize the results, the Kp-BSB-A genome was reannotated as KpBSB31 following the same methods as for KpV3. GrapeTree (Zhou et al.,

²<https://github.com/fmalmeida/MpgAP>

³<https://github.com/nanoporetech/medaka>

⁴<https://github.com/fmalmeida/bacannot>

2018) was used via the BIGSdb database⁵ to reconstruct and visualize the relationships among *K. pneumoniae* STs using the Minimum Spanning tree v2 (MSTreeV2) algorithm. Moreover, GCluster v2.0.6 (Li et al., 2020) was used to draw the figure with the gene cluster comparison of the *blaKPC* genes.

RESULTS

Biological Characterizations

The sequencing of 16S fragment amplicons and biochemical assays of the isolate (KpV3) were compatible with *Klebsiella* spp. It also presented characteristic pink mucoid colonies in Macconkey agar medium. Antibiotic resistance profiles revealed that the bacterial isolate was only susceptible to aminoglycosides (amikacin, gentamicin, and tobramycin) (Supplementary Table 1). Therefore, it can be classified as a multidrug-resistant isolate (Magiorakos et al., 2012).

Genomic Analyses

Sequence data obtained by long read nanopore DNA sequencing was used to assemble the genome of the studied strain. The resulting assembly comprised 5.4 Mb and showed great levels (98.5%) of gene space completeness based on BUSCO metrics (Table 1). The genome includes 5,132 CDS (coding sequences), 25 rRNA and 86 tRNA related sequences. Besides the chromosomal scaffold, two plasmid replicons, *ColRNAI* and *IncU*, have been detected. The genome was identified as *K. pneumoniae* by the TYGS, and this result was further validated with ANI analyses against available *Klebsiella* genomes in NCBI Refseq, showing the *K. pneumoniae* strain 2504 (GCF_011044895.1), from a study in Russia on hypervirulent *K. pneumoniae* isolates (PRJNA606163), as the closest genome available with 99.71 ANI index.

Molecular Typing

Since some *Klebsiella* K and O serotypes are related to increased virulence particularly K1 and O1 serotypes, the identification of these loci is important for the rapid detection of high-risk clones (Paschoal et al., 2017; Andrade et al., 2020). Genome analysis enabled the classification of KpV3 strain as a KL45:O1v2 *K. pneumoniae* strain. The O1 serotype is one of the most common serotypes in clinically relevant *K. pneumoniae* isolates and is often associated with increased virulence (Hsieh et al., 2012; Fang et al., 2016), thus the identification of an O1 strain in an urban lake near the hospital is worrisome. Moreover, using the public BIGSdb *K. pneumoniae* MLST scheme the strain KpV3 was classified as a novel ST: 5236.

Antimicrobial Resistance Genes and Virulence Genes

We performed the search for ARGs using three different tools and databases, namely AMRFinderPlus, CARD-RGI and Resfinder, in order to have a more comprehensive overview of

the annotation, due to differences in database gene content and curation, as well as prediction schemes. All three software, in concert, detected genes for beta-lactams (*blaSHV-121*, *blaCTX-M-15*, and *blaKPC-2*) and fosfomycin (*fosA*) (Table 2). Moreover, several multidrug efflux pumps (*kdeA*, *emrD*, *oqxAB*, and *acrAB*) were also detected by at least one database. The efflux pump *oqxAB* has been regularly implicated in low to intermediate resistance to quinoxalines, quinolones, tigecycline, nitrofurantoin, several detergents and disinfectants (Li et al., 2019). Furthermore, the *acrAB* is an important intrinsic virulence factor, which has been shown to provide resistance to host-derived antimicrobial peptides in *E. coli* (Swick et al., 2011) and when overexpressed, contributes to multidrug resistance. Additionally, AMRFinderPlus also detected in the genome, genes conferring heavy metal resistance (*fieF* and *arsC*). Resfinder has identified multiple point mutations in the *acrR*, *ompK36*, and *ompK37* genes which are predicted to confer together resistance to fluoroquinolones, carbapenems and cephalosporins.

In terms of acquired resistance genes, a *bla-CTX-M-15* gene was found within the flanking region (3.3 kb distance) of a 39.2 kb *Siphoviridae* gene cluster in the bacterial chromosome, which could be a putative source to mobility to this gene. As originally discussed by Chen et al. (2014), the most common MGE associated with *blaKPC* in *K. pneumoniae* is the 4401 transposon (tn), while other MGEs were classified NTE_{KPC}. Most NTE_{KPC}s share at least a truncated version of the *ISKpn6* insertion sequence gene downstream of *blaKPC*, with sub-type divisions depending on the gene composition found upstream of *blaKPC*, such as the presence of *blaTEM*. In KpV3, the *blaKPC-2* gene was found in association with a truncated insertion sequence (IS) ISKpn6, a Tn3 resolvase and an IS26, forming a putative NTE_{KPC} of approximately 3 kb (Figure 1). In this element, the IS 26 and *tnpR* resolvase are upstream of *blaKPC*, without *blaTEM* sequences, as it occurs with NTEKPC-1b and NTEKPC-1d. However, the *ISKpn8* sequence is absent in the observed NTE_{KPC}, which indicates that the element found in KpV3 is a putative novel group I NTE_{KPC}. Furthermore, the IS26 is found in an opposite orientation when compared to the other NTE_{KPC} sequences, which could indicate an independent transposition event with this IS alone (Figure 1).

The search for VGs detected, in the chromosome of KpV3, the presence of VGs related to some classical *K. pneumoniae* virulence factors such as the phenolate siderophore enterobactin (*entABCEF*, *fepABCDG*, *fes*, and *ybdA*) and types I and III fimbriae (*fimABCDEFGHIK* and *mrkABCFHIJ*) (Table 2). Moreover, the *iroE* (salmochelinsiderophore) gene was also detected in the genome. The production of more than one type of siderophore is a characteristic of more virulent bacterium (Marr and Russo, 2019). Furthermore, several genes (*tssBCDFGHIJKLM*) related to the Type VI secretion system (T6SS) have also been detected. The T6SS is an apparatus related to bacterial competition, cell invasion and *in vivo* colonization, as well as DNA acquisition from other bacteria or metal acquisition from the environment, thus, capable of enhancing the bacterium environment fitness (Ho et al., 2014; Liu et al., 2017; Barbosa and Lery, 2019; Coulthurst, 2019). Upon visual inspection in Artemis genome browser and domain prediction from their

⁵<https://bigsdh.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>

TABLE 1 | KpV3 genome assembly statistics.

Strain	Genome accession (NCBI)	Estimated long read Coverage	Assembly size (Mb)	Contigs (≥200 bp)	N50	BUSCO C; CS/CD/F/M	Plasmid replicons
KpV3	GCA_019038575.1	475	5.4	7	5,353,194	98.5%; 98.0/0.5/0.7/0.8	ColRNAI, IncU

The BUSCO Enterobacteriales database (440 genes) was used to evaluate the completeness of the assembly. BUSCO numbers reported are percentage complete (C) followed by the percentages of complete single-copy (CS), complete duplicated (CD), fragmented (F), and missing (M) out of 440 genes.

putative proteins in CDvist (Fouz et al., 2020), we have found three VgrG4-like genes, which are T6SS effectors.

Comparative Genomics

A total of 74 *K. pneumoniae* genomes have been used to reconstruct a core genome phylogeny with Parsnp (Treangen et al., 2014; Figure 2). As expected, the KpV3 sample was placed as the single representative of a tree branch, meaning that closer genomes may exist but have not yet been identified. Most of the strains in the tree were isolated from clinical environments, which further indicates a bias toward sequencing of clinical isolates.

TABLE 2 | Summary of KpV3 and KpBSB31 genes related to virulence and antimicrobial resistance.

Characteristics	KpV3	KpBSB31
Sequence type (ST)	5236	11
Antimicrobial resistance to:		
Beta-lactams	<i>blaCTX-M-15</i> , <i>blaSHV-121</i> , <i>blaKPC-2</i>	<i>blaSHV-182</i> , <i>blaKPC-2</i> , <i>blaLAP-2</i>
(Fluoro) quinolones	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS1</i>
Fosfomycin	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>
Sulfonamide		<i>sul1</i> , <i>sul2</i>
Tetracycline		<i>tetA</i> , <i>tetD</i>
Trimethoprim		<i>dhfr1</i>
Efflux pumps	<i>emrD</i> , <i>kdsA</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i>	<i>emrD</i> , <i>kdsA</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i>
Heavy metal resistance genes to:		
Iron stress	<i>feoF</i>	<i>feoF</i>
Arsenic	<i>arsC</i>	<i>arsC</i>
Quaternary ammonium compounds		<i>qacEdelta1</i>
Acid resistance		<i>asr</i>
Virulence genes to:		
Type 1 fimbriae	<i>fimABCDEFGHIK</i>	<i>fimABCDEFGHIK</i>
Type 3 fimbriae	<i>mrkABCDHFJ</i>	<i>mrkABCDHFJ</i>
Type VI secretion system	<i>tssBCDFGHUKLM</i> , <i>flf1</i> , <i>flf7</i>	<i>tssBCDFGHUKLM</i> , <i>flf1</i> , <i>flf7</i>
Enterobactin	<i>entABCEF</i> , <i>fepABCDG</i> , <i>fes</i> , <i>ybcA</i>	<i>entABCEF</i> , <i>fepABCDG</i> , <i>fes</i> , <i>ybcA</i>
Salmocheilin	<i>iroE</i>	<i>iroE</i>
Yersiniabactin		<i>fyuA</i> , <i>ip1</i> , <i>ipr2</i> , <i>ybtAEPQSTUX</i>
Plasmids	<i>ColRNAI</i> , <i>IncU</i>	<i>Col40I</i> , <i>ColRNAI</i> , <i>IncA/C2</i> , <i>IncFB(pKPHST)</i> , <i>IncN</i> , <i>IncR</i>
Prophage-related sequences	5	5
GenBank accession number	SAMN19730657	SAMEA10455488T

Interestingly, although collected from very near locations, the KpV3 and KpBSB31 samples are placed distantly to each other, highlighting the genetic difference among clinical and environmental samples. In summary, these results emphasize the diversity of the *K. pneumoniae* species and underscore the need of more sequencing efforts on clinical and non-clinical samples to better understand the true extent of phylogenetic relationships in the species.

The reconstruction and visualization of relationships among *K. pneumoniae* STs enabled the observation that the ST 5236 (KpV3) does not have close relationships to worldwide threat STs such as ST 11, 14, and 258 (Figure 3). In fact, the results show the ST 5236 placed in a branch closer to STs 874, 1041, 1072, and 1128, in a bigger group of STs with 515 as founder. Among the closest STs, the majority of the deposited isolates comes from human hosts. This could indicate that either there is a bias toward isolation of hospital-born bacteria and/or that KpV3 could share important genomic features with hospital-born isolates.

For comparative purposes, we contrasted the presence/absence of ARGs and VGs with KpBSB31 (Table 2). The KpBSB31 (Kp-BSB-A) was isolated from the blood of a 60- to 70-year-old patient deceased 18 days after hospitalization (de Campos et al., 2018). The hospital from which the KpBSB31 sample was collected is very near to the KpV3 isolation site. Although we are analyzing and comparing only two isolates, the comparison between these samples could highlight the putative horizontal gene transfer between clinical and environmental samples. As expected, in terms of predicted gene content, the clinical sample KpBSB31 is more virulent and more resistant to antibiotics than the environmental sample KpV3, however it is possible to observe the presence and maintenance of relevant genes in KpV3 such as *iroE*, *blaCTX-M*, and *blaKPC*. Interestingly, the *ColRNAI* plasmid has been found to be almost identical (>99% identity) between samples. The maintenance of plasmids, VGs and ARGs in environmental strains is worrisome as they can act as a reservoir, playing a key role in the dissemination of different genetic traits (Huijbers et al., 2019; Fouz et al., 2020).

DISCUSSION

In the present study we have identified an environmental *K. pneumoniae* isolate belonging to a novel sequence type, ST 5236 and displaying capsular serotype (K) KL45 and LPS serotype (O) O1v2. With respect to the K antigens, there are currently 78 serotypes, despite having more than 130 allelic combinations in its biosynthetic locus (KLS) (Wick et al., 2018;

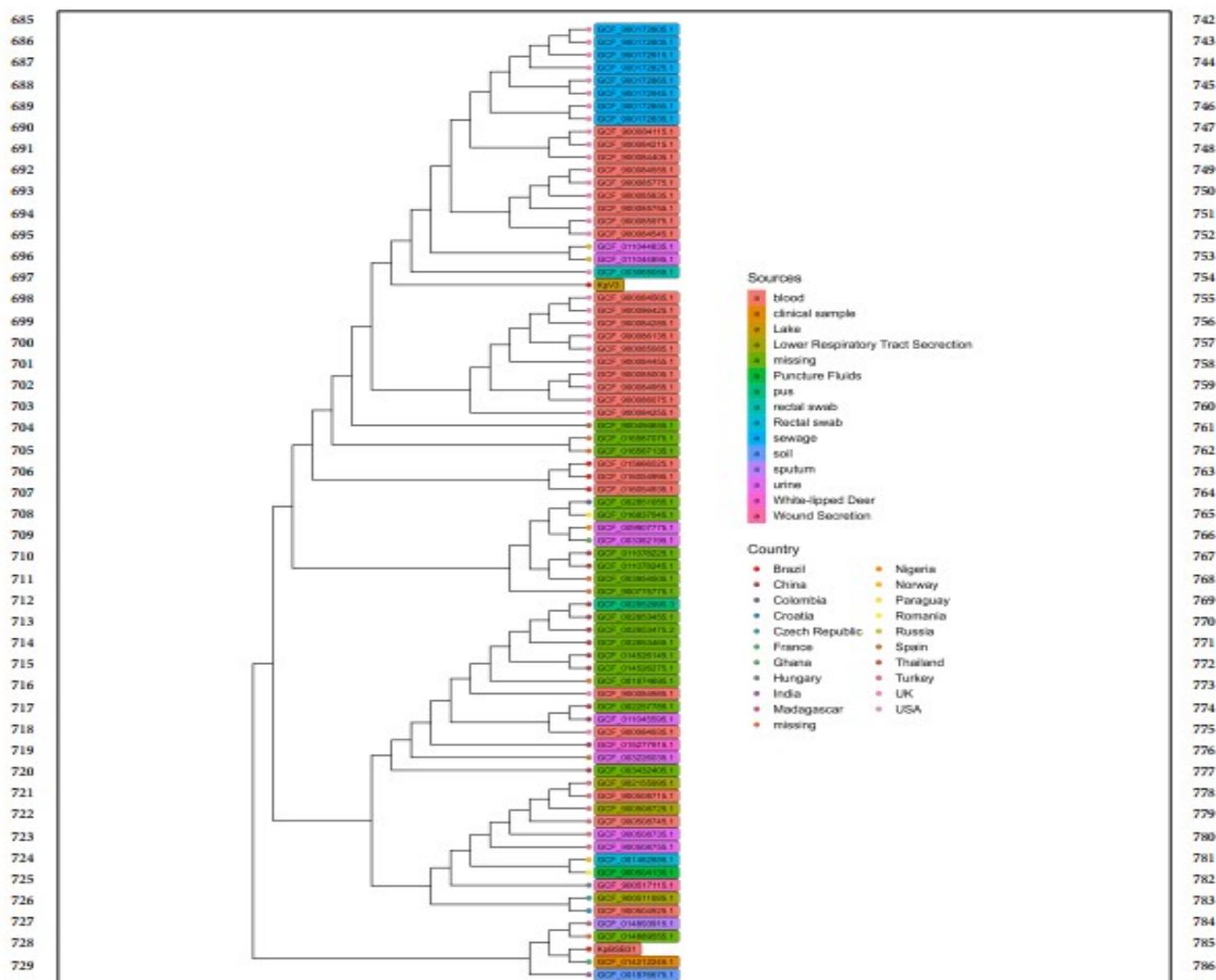


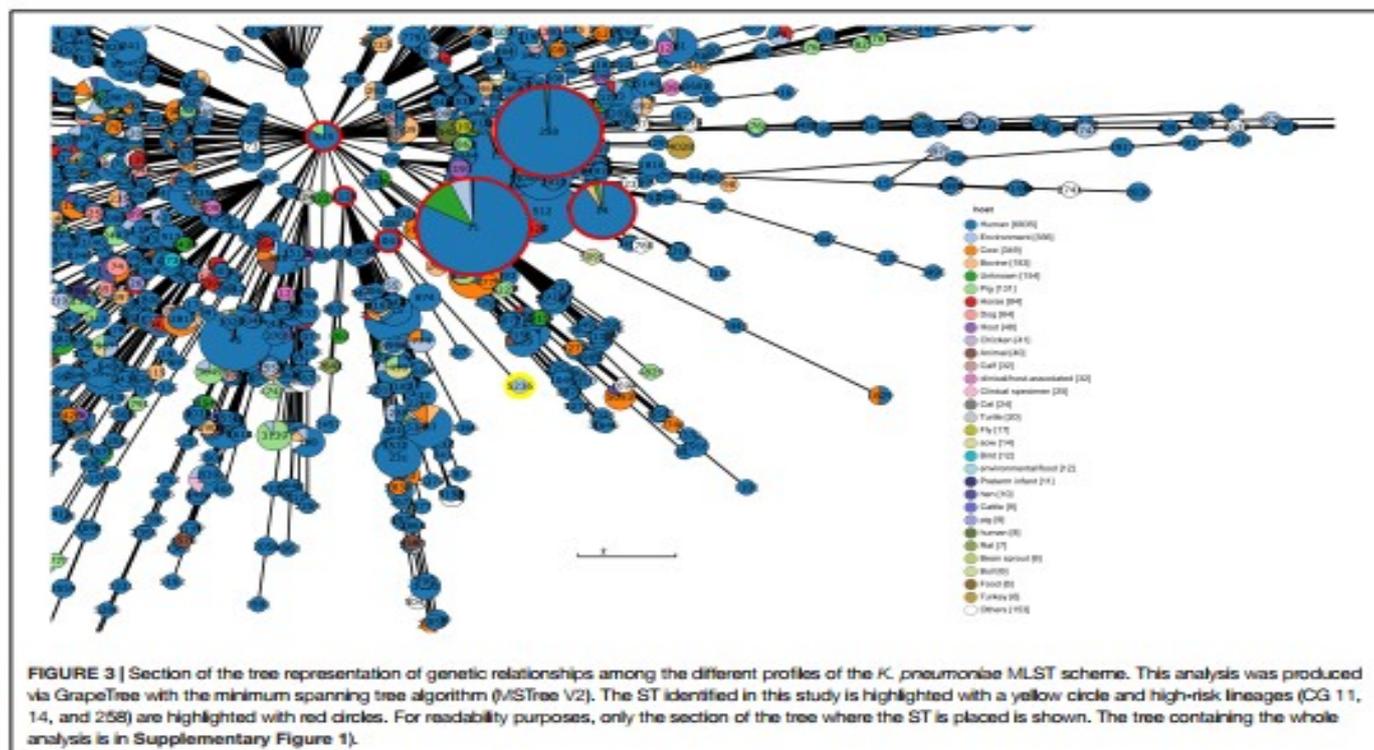
FIGURE 2 | Core genome phylogeny reconstructed with Parsnp using genomes with at least 99 ANI score with KpV3. Branch tips and genome names have been respectively colored based on country and isolation sources.

from different environments or a strategy for quickly acquiring genes from them.

Although this notion has been long known by Brazilian indigenous people (Krenak, 2020), the “One World-One health” concept was established in 2004 as a form to understand human health. As this concept goes, human health is dependent on animal health, both domestic and wild, and on

environmental health. Increasing, modern anthropic pressures on the environment, such as pollution, habitat destruction and others, promote changes in its composition, which ultimately leads to the increase in frequency and intensity of disease-states in humans (Destoumieux-Garzón et al., 2018).

Nevertheless, the sequencing efforts for *K. pneumoniae* are mainly focused on clinical samples, a bias reflected in the



phylogenetic analysis presented in Figure 3 where KpV3 has been placed in an undivided branch and the majority of bacterial isolates in the tree come from human samples. Besides, the samples derived from the sewer were actually taken from hospital effluents. Not only the AMR gene profile found in WWTPs reflects that of clinical settings (Pärnänen et al., 2019), but surveillance in WWTPs could represent a more accurate perspective of AMR spread at a populational level (Sims and Kasprzyk-Hordern, 2020). Moreover, a similar pattern was also observed in the MLST tree analysis (Figure 4) where the branch length represents the distance between groups. The analysis shows that the ST 5236 (KpV3) has a reasonable distance to its closest ST (ST 1041), which means that closer STs might exist, but are not yet identified. It is important to observe that this new ST is not related to other worldwide threat STs such as ST 11 and 258, meaning that this new ST might not be a threat in terms of hypervirulence.

It is disturbing that we have found an environmental *K. pneumoniae* strain containing both an ESBL (CTX-M-15) and a carbapenemase (KPC-2) enzyme, which raises concern about the selective pressure applied in the region. Of special note, both genes have been found inside or very near MGEs. The *bla*-CTX-M-15 was found in the bacterial chromosome, close to a putative *Siphoviridae* prophage sequence. This viral family has been associated with human fecal pollution in water bodies and with beta-lactamase gene transfer (Colomer-Lluch et al., 2011). Furthermore, the *bla*KPC2 gene was found in association

with a transposase gene, forming a small gene cluster with two other genes. *Klebsiella* spp. ISs are often associated with AMR genes (Razavi et al., 2020) and transposition events can be an important factor in spreading these genes in contexts of positive selection among different plasmids, strains and species (Sheppard et al., 2016).

When comparing the genomes of the environmental KpV3 and the clinical isolate KpBSB31, we have detected that the *ColRNAI* plasmid is identical between the samples, which indicates a putative genetic flow of mobile elements between clinical and environmental isolates in the lake near the hospital. Similar observations of gene flows from hospitals water bodies have been made elsewhere (Ekwanzala et al., 2019; Lepuschitz et al., 2019; Bleichenbacher et al., 2020). However, it is unclear whether KpV3 isolate represents a clonal dispersion of hospital *K. pneumoniae* or if it has acquired genetic features from hospital-borne isolates via HGT. The extent of this genetic flow should be addressed by sampling different parts of the hospital system wastewater treatment. Thorough analyses of microbes discharged from the WWTPs into Paranoá lake are required to access the extent of their contribution to dissemination of AMR. Furthermore, the quantification of antibiotics and heavy metals in WWTPs, which may select/co-select resistant microbes (Hernando-Amado et al., 2019), is also of relevance, though fecal pollution alone may be the main factor in AMR spread (Karkman et al., 2019). Finally, Ekwanzala et al. (2019) have shown that in a river which receives WWTP effluent, a larger

ratio of carbapenem resistant versus susceptible *K. pneumoniae* strains was found in its sediment, in contrast to surface waters. Thus, different portions of a given water body could weigh more in AMR maintenance. Danko et al. (2021) have analyzed >4,000 metagenomic samples from 60 cities around the world, as to characterize their urban microbiomes. Even with these many samples, the rarefaction curves for microbial species and ARGs did not saturate, indicating there is a considerable amount of diversity to be explored, particularly when considering the selective pressures for the formation of new ARGs and MGEs.

Brasília is located in a morphoclimatic domain, termed Cerrado, with two well-defined seasons, wet and dry. As a consequence of the dry season, the city has undergone into situations of water scarcity in recent years. As a response, Paranoá lake, which receives treated effluent from two WWTPs, has been turned into an environmental buffer for water reuse, including drinking water (Sodré and Sampaio, 2020). Hence, the discovery of an ESBL producer carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolate in this lake is of great concern, as regions undergoing water scarcity might become more susceptible to AMR spread, despite the presence of downstream water treatment processes. Additionally, climate change models based upon Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) scenarios predict increases in temperature and dry season duration as well as precipitation decreases for the Cerrado biome (Bustamante et al., 2012). MacFadden et al. (2018) have shown that increases in minimal local temperatures are associated with higher frequency of infections caused by antimicrobial-resistant *E. coli*, *S. aureus*, and *K. pneumoniae*. Also, Anderson et al. (2008) have shown that *K. pneumoniae* blood stream infections occur more commonly with higher temperatures and dew point. There are many, non-excluding hypotheses for the causes of this correlation, from bacterial physiology to human societal changes (Rodríguez-Verdugo et al., 2020). Collignon et al. (2018) point that socioeconomic factors such poor infrastructure and governance, low health expenditure and high GDP and education were associated with higher AMR levels around the world. As the authors discuss, while temperature was positively correlated with AMR, this could be a correlation by proxy (Such as poor infrastructure) or a direct correlation. As water reuse may become more common as a result of climate change (Tram et al., 2014), this phenomenon may play a key role in AMR spread and warrants further inquiry.

Altogether, we have little evidence in favor of KpV3 as an isolate with high virulence. However, our observations suggest that there is a gene flow from hospitals into the lake, likely through WWTPs. While our findings point toward this hypothesis, it has been based so far on a single isolate. Therefore, the extent of ARG dissemination into the lake and how it may

REFERENCES

Adebali, O., Ortega, D. R., and Zhulin, I. B. (2015). CDvist: a webserver for identification and visualization of conserved domains in protein

be represented in other isolates are a matter of future studies. Furthermore, there may be a positive selective pressure being applied in the Paranoá lake that may promote the selection and spread of potentially untreatable carbapenemase-producing bacteria while turning the region as a possible reservoir for ARGs. Thus, genomic surveillance and quality assessment programs with the wastewaters that are dumped in the lake are required to control and mitigate such pressure.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repository(s) and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Bioproject/PRJNA738490>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LJ and TD performed the strain isolation and phenotypic characterizations. LJ, FA, and RB performed the genome sequencing and bioinformatics analyses. GP, TC, and VM conceived and supervised the study. LJ, FA, GP, TC, and VM wrote the manuscript and analyzed the data. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), grant 00193-00000129/2019-80 to GP and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant 205555/2018-7 and grant 433790/2018-0 to VM. This study was partially financed by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) as a fellowship to LJ (140826/2017-3) and to FA (140576/2020-7).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.732324/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Tree representation of genetic relationships among the different profiles of the *K. pneumoniae* MLST scheme. This analysis was produced via GrapeTree with the minimum spanning tree algorithm (MSTree V2). The ST identified in this study is highlighted with a yellow circle and a red arrow. High-risk lineages (CG 11, 14, and 258) are highlighted with red circles.

sequences. *Bioinformatics* 31, 1475–1477. doi: 10.1093/bioinformatics/btu836

Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., et al. (2019). CARD 2020: antibiotic resistome surveillance

- with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 48, D517–D525.
- Anderson, D. J., Richet, H., Chen, L. F., Spelman, D. W., Hung, Y., Huang, A. T., et al. (2008). Seasonal variation in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection on 4 continents. *J. Infect. Dis.* 197, 752–756. doi: 10.1086/527486
- Andrade, V. C., Caetano, T., Mendo, S., and Oliveira, A. J. F. C. (2020). Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* from port areas in São Paulo State (Brazil): isolation and molecular characterization. *Mar. Pollut. Bull.* 159:11329. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111329
- Barbosa, V. A. A., and Lery, L. M. S. (2019). Insights into *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system transcriptional regulation. *BMC Genomics* 20:506. doi: 10.1186/s12864-019-5885-9
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., et al. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 310–317.
- Bevan, E. R., Jones, A. M., and Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 2145–2155. doi: 10.1093/jac/dkx146
- Bleichenbacher, S., Stevens, M. J. A., Zurluh, K., Perreten, V., Endimiani, A., Stephan, R., et al. (2020). Environmental dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in rivers in Switzerland. *Environ. Pollut.* 265:115081. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115081
- Bortolola, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattor, V., et al. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 3491–3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345
- Bush, K., and Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 33, e47–e19.
- Bustamante, M., Nardoto, G., Pinto, A., Resende, J., Takahashi, F., and Vieira, L. (2012). Potential impacts of climate change on biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems. *Braz. J. Biol.* 72(Suppl. 3), 655–671. doi: 10.1590/s1519-69842012000400005
- Cantón, R., González-Alba, J. M., and Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front. Microbiol.* 3:110. doi: 10.3389/fmicb.2012.00110
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., et al. (2014). In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3895–3903. doi: 10.1128/AAC.02412-14
- Cerdeira, L. T., Lam, M. M. C., Wyres, K. L., Wick, R. R., Judd, L. M., Lopes, R., et al. (2019). Small IncQ1 and Col-like plasmids harboring bla_{KPC-2} and Non-Tn 4401 elements (NTE_{KPC}-IId) in high-risk lineages of *Klebsiella pneumoniae* CG258. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, doi: 10.1128/AAC.02140-18
- Chen, L., Mathema, B., Chavda, K. D., DeLeo, F. R., Bonomo, R. A., and Kreiswirth, B. N. (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol.* 22, 686–696. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.003
- Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S., and Laxminarayan, R. (2018). Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariate analysis. *Lancet Planetary Health.* 2, e398–e405. doi: 10.1016/S2542-5196(18)30186-4
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. Aziz R, organizador. *PLoS One* fce17549. doi: 10.1371/journal.pone.0017549
- Coulthurst, S. (2019). The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology* 165, 503–515. doi: 10.1099/mic.0.000789
- Danko, D., Bezdán, D., Afshin, E. E., Ahsanuddin, S., Bhattacharya, C., Butler, D. J., et al. (2021). A global metagenomic map of urban microbiomes and antimicrobial resistance. *Cell* 184, 3376.e17–3393.e17. doi: 10.1016/j.cell.2021.05.002
- de Araujo, C. F. M., Silva, D. M., Carneiro, M. T., Ribeiro, S., Fontana-Maurell, M., Alvarez, P., et al. (2016). Detection of carbapenemase genes in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4380–4383. doi: 10.1128/AAC.02753-15
- de Campos, T. A., Gonçalves, L. F., Magalhães, K. G., de Paulo Martins, V., Pappas Júnior, G. J., Peirano, G., et al. (2018). A fatal bacteremia caused by hypermucoviscous KPC-2 producing extensively drug-resistant K64-ST11 *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Front. Med.* 5:265. doi: 10.3389/fmed.2018.00265
- Destoumieux-Garzon, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., et al. (2018). The one health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front. Vet. Sci.* 5:14. doi: 10.3389/fvets.2018.00014
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A. D., and Brisse, S. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4178–4182. doi: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005
- Dropa, M., Lincopan, N., Balsalobre, L. C., Oliveira, D. E., Moura, R. A., Fernandes, M. R., et al. (2016). Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4953–4958. doi: 10.1007/s11356-016-6079-5
- Ekwanzala, M. D., Dewar, J. B., Kamika, I., and Momba, M. N. B. (2019). Tracking the environmental dissemination of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* using whole genome sequencing. *Sci. Tot. Environ.* 691, 80–92. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.533
- Fang, C.-T., Shih, Y.-J., Cheong, C.-M., and Yi, W.-C. (2016). Rapid and accurate determination of lipopolysaccharide O-antigen types in *Klebsiella pneumoniae* with a Novel PCR-based O-genotyping method. Munson E, organizador. *J. Clin. Microbiol.* 54, 666–675. doi: 10.1128/JCM.02494-15
- Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D. H., Prasad, A. B., Slotta, D. J., Tolstoy, I., et al. (2019). Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e483–e419.
- Fouz, N., Pangesti, K. N. A., Yasir, M., Al-Malki, A. L., Azhar, E. I., Hill-Cawthorne, G. A., et al. (2020). The contribution of wastewater to the transmission of antimicrobial resistance in the environment: implications of mass gathering settings. *Trop. Med. Infect. Dis.* 5:33. doi: 10.3390/tropicalmed5010033
- Gillings, M. R., Westoby, M., and Ghaly, T. M. (2018). Pollutants that replicate: xenogenetic DNAs. *Trends Microbiol.* 26, 975–977. doi: 10.1016/j.tim.2018.08.003
- Gomi, R., Matsuda, T., Yamamoto, M., Chou, P.-H., Tanaka, M., Ichiyama, S., et al. (2018). Characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in wastewater revealed by genomic analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e2501–e2517.
- Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A., and Leong, D. (1994). PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 32, 335–351. doi: 10.1128/jcm.32.2.335-351.1994
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., and Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat. Microbiol.* 4, 1432–1442. doi: 10.1038/s41564-019-0503-9
- Ho, B. T., Dong, T. G., and Mekalanos, J. J. (2014). A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe* 15, 9–21. doi: 10.1016/j.chom.2013.11.008
- Hsieh, P.-F., Lin, T.-L., Yang, F.-L., Wu, M.-C., Pan, Y.-J., Wu, S.-H., et al. (2012). Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess. Forestier C, organizador. *PLoS One* 7:e33155. doi: 10.1371/journal.pone.0033155
- Huang, Y.-T., Liu, P.-Y., and Shah, P.-W. (2020). Homopolish: a method for the removal of systematic errors in nanopore sequencing by homologous polishing. *Genome Biol.* 22:95. doi: 10.1186/s13059-021-02282-6
- Huijbers, P. M. C., Flach, C.-F., and Larsson, D. G. J. (2019). A conceptual framework for the environmental surveillance of antibiotics and antibiotic resistance. *Environ. Int.* 130:104880. doi: 10.1016/j.envint.2019.05.074
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., and Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* 9:5114.
- Karkman, A., Pärnänen, K., and Larsson, D. G. J. (2019). Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat. Commun.* 10:80. doi: 10.1038/s41467-018-07992-3
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., et al. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E3463–E3470. doi: 10.1073/pnas.1717295115
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., and Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat. Biotechnol.* 37:12.
- Krenak, A. (2020). *Ideas to Postpone the End of the World*. Toronto: House of Anansi Press, 88.

1255	harboring the blaKPC gene in a non-classical transposon element. <i>BMC Microbiol.</i> 21:107. doi: 10.1186/s12866-021-02169-3	1312	Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.	1313
1256		1314		
1257	Wyres, K. L., and Holt, K. E. (2018). <i>Klebsiella pneumoniae</i> as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. <i>Curr. Opin. Microbiol.</i> 45, 131–139. doi: 10.1016/j.mib.2018.04.004	1315	Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.	1316
1258		1317		
1259	Wyres, K. L., Lam, M. M. C., and Holt, K. E. (2020). Population genomics of <i>Klebsiella pneumoniae</i> . <i>Nat Rev Microbiol.</i> 18, 344–359.	1318	Copyright © 2021 Janssen, de Almeida, Damasceno, Baptista, Pappas, de Campos and Martins. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.	1319
1260		1320		
1261	Yang, X., Dong, N., Chan, E. W.-C., Zhang, R., and Chen, S. (2021). Carbapenem resistance-encoding and virulence-encoding conjugative plasmids in <i>Klebsiella pneumoniae</i> . <i>Trends Microbiol.</i> 29, 65–83. doi: 10.1016/j.tim.2020.04.012	1321		1322
1262		1323		1324
1263	Zhang, X., Li, F., Cui, S., Mao, L., Li, X., Awan, F., et al. (2020). Prevalence and distribution characteristics of bla _{KPC-2} and bla _{NDM-1} genes in <i>Klebsiella pneumoniae</i> . <i>Infect. Drug Resist.</i> 13, 2901–2910. doi: 10.2147/idr.s253631	1325		1326
1264		1327		1328
1265	Zhou, Z., Alikhan, N.-F., Sergeant, M. J., Luhmann, N., Vaz, C., Francisco, A. P., et al. (2018). GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. <i>Genome Res.</i> 28, 1395–1404. doi: 10.1101/gr.232397.117	1329		1330
1266		1331		1332
1267		1333		1334
1268		1335		1336
1269		1337		1338
1270		1339		1340
1271		1341		1342
1272		1343		1344
1273		1345		1346
1274		1347		1348
1275		1349		1350
1276		1351		1352
1277		1353		1354
1278		1355		1356
1279		1357		1358
1280		1359		1360
1281		1361		1362
1282		1363		1364
1283		1365		1366
1284		1367		1368
1285				
1286				
1287				
1288				
1289				
1290				
1291				
1292				
1293				
1294				
1295				
1296				
1297				
1298				
1299				
1300				
1301				
1302				
1303				
1304				
1305				
1306				
1307				
1308				
1309				
1310				
1311				

19 ANEXO A – DOCUMENTO DE CADASTRO NA PLATAFORMA SISGEN ACERCA DA LINHAGEM KPV3



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A373E15

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A373E15**
 Usuário: **Universidade de Brasília**
 CPF/CNPJ: **00.038.174/0001-43**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Impossibilidade de identificação

Título da Atividade: **Isolamento, Identificação e Caracterização de Bactérias Degradadoras de Poluentes Emergentes**

Equipe

VICENTE DE PAULO MARTINS **Universidade de Brasília**

Data do Cadastro: **29/04/2021 17:12:39**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:13 de 29/04/2021.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**